



**INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL**  
DESDE 1902



**UNIVERSIDADE  
NOVA  
DE LISBOA**

**Universidade Nova de Lisboa  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Inibidores de prenilação como uma nova estratégia  
terapêutica de tratamento da infeção por HDV**

**Maryna Tsishkovska**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em  
especialidade de Biologia Molecular em Medicinal Tropical e Internacional

Outubro, 2017



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

## **Inibidores de prenilação como uma nova estratégia terapêutica de tratamento da infeção por HDV**

**Autor:** Maryna Tsishkovska

**Orientador:** João Tavanéz

**Coorientador:** Celso Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

“O que hoje não sabemos, amanhã saberemos”  
Garcia de Orta

## **Agradecimentos**

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração e estímulos de diversas pessoas ao longo destes vários meses de trabalho. Manifesto, por isso os meus sinceros agradecimentos a todos.

Em primeiro lugar, agradeço profundamente aos meus pais, por serem um modelo de coragem, por todo apoio incondicional, ajuda, compreensão e carinho que sempre demonstraram. Sem eles este projeto não faria o mesmo sentido.

Ao Professor João Tavanez, meu orientador, para quem todos os meus agradecimentos são poucos. Pelo empenho, motivação, supervisão e sobretudo pela disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização deste trabalho. Pela partilha de preciosos conhecimentos científicos ao longo de todo o processo de investigação.

Ao Professor Celso Cunha, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por acreditar em mim! Pelo grande impulso que proporcionou a este projeto. Pelo apoio e esclarecimento de dúvidas ao longo da investigação.

Ao Rafael Caetano, o meu colega de bancada, pela amizade, ajuda, apoio e partilha de protocolos, resultados e ideias.

A todos os que se cruzaram comigo no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Higiene e Medicina Tropical ao longo destes meses de trabalho.

Aos meus amigos, Ana Lima, Ana Cardeal, Rodolfo Cardoso, Tiago Marques, pela amizade e constante motivação fornecida. E a todos aqueles amigos que não estão aqui referidos de uma forma direta, o meu muito obrigada por serem o que de mais especial existe.

Aos meus avós por terem sido o grande apoio de toda a minha vida e por todo o carinho.

Para a restante família, tios e primos, o meu muito obrigada, por todo amor e apoio.

Ao meu Vítor, porque consegue sempre fazer-me acreditar que consigo, principalmente nos momentos de incerteza, porque a confiança que tem em mim dá-me forças para

enfrentar novos desafios. Agradeço, por valorizar tudo quanto sou no mínimo que faço. Sem ele este projeto, de certeza, não seria possível.

A todos que de forma direta ou indireta me motivaram e apoiaram na realização deste trabalho.

## Resumo

O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente responsável pela forma mais severa e mortal de hepatite viral. O HDV co-infeta ou super-infeta hepatócitos previamente infectados pelo vírus da hepatite B (HBV), aumentando o risco de desenvolvimento de cirrose, carcinoma hepatocelular (CHC) e hepatite fulminante. A associação clínica entre estes dois vírus é justificada pelo facto do invólucro externo do HDV ser constituído pelas proteínas de superfície do HBV (HBsAgs).

O genoma do HDV é constituído por uma única molécula de RNA circular de cadeia simples, que codifica uma única proteína, o antigénio delta (HDAg). A ocorrência de um mecanismo de *editing* do RNA, resulta na expressão de duas formas do HDAg, a pequena (S-HDAg) e a grande (L-HDAg). Estas duas proteínas virais desempenham funções várias no ciclo do HDV, enquanto que o S-HDAg estimula a replicação do RNA viral, o L-HDAg é responsável pela interação com os HBsAgs para formar partículas virais.

Tendo em conta a inexistência de uma terapia disponível para a hepatite delta, é essencial o desenvolvimento de novas terapêuticas mais eficazes e seguras. A necessidade de encontrar novas opções terapêuticas levou ao desenvolvimento de fármacos dirigidos a moléculas específicas relevantes no ciclo do vírus delta. Este é o caso do mecanismo de prenilação do L-HDAg, catalisado por enzimas celulares do grupo das farnesil-transferases. Desta forma, inibidores desta enzima celular poderão constituir uma abordagem terapêutica promissora da infeção provocada por HDV.

A necessidade de encontrar novas opções terapêuticas, levou-nos a desenvolver um estudo em que se avaliou o potencial terapêutico dos inibidores de farnesil-transferases tais como FTI-277, compostos A e B nas células da linha celular Huh7D12, avaliando o impacto em termos de viabilidade celular e correlacionando a capacidade dos fármacos de intervir nos níveis de expressão do genoma viral do HDV. Avaliamos ainda a ação destes inibidores sobre a expressão de oncogenes associados ao desenvolvimento de CHC.

Para tal, as células Huh7D12 foram incubadas com concentrações crescentes de FTI-277, composto A e B durante 48h. A viabilidade celular foi testada utilizando o *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit* e os níveis de expressão do RNA genómico do HDV e de oncogenes (STAT3, NF-kB, PIM1, BMP5, CDK2) através da reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos.

A análise dos efeitos em termos de viabilidade celular demonstrou que os compostos A e B são menos tóxicos para as células da linha celular Huh7D12 do que o inibidor comercial FTI-277 face às mesmas concentrações de fármaco. Verificou-se também que os compostos A e B, tal como o fármaco comercial FTI-277, apresentam o mesmo efeito sobre a expressão do RNA genómico do HDV e os oncogenes STAT3 e NF-kB, porém com menor interferência na viabilidade celular, o que pode contribuir para melhorar a eficácia terapêutica com diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os fármacos dirigidos a farnesil-transferases celulares podem constituir uma nova abordagem terapêutica promissora no tratamento da hepatite delta crónica e como supressores de processos cancerígenos.

**Palavras-chave:** vírus da hepatite delta; prenilação; inibidores de farnesil-transferases; carcinoma hepatocelular; oncogene

## Abstract

Hepatitis delta virus (HDV) is the causative agent of one of the most severe forms of viral hepatitis. HDV occurs either coinfection or as superinfection in patients with pre-existing hepatitis B virus (HBV) infection and increases the risk and rapid progression to cirrhosis, hepatocellular carcinoma (CHC) and fulminant liver failure. The clinical association between these two viruses is justified by the fact that the envelope of HDV is composed by hepatitis B surface antigens (HBsAgs).

The HDV genome is a circular single-stranded RNA molecule, which encodes a single protein called the delta antigen (HDAg). The occurrence of an RNA editing mechanism results in expression of the two delta antigen isoforms, the small (S-HDAg) and the large (L-HDAg). Both forms of these viral proteins are important for distinct steps within the HDV life cycle, whereas the S-HDAg supports HDV replication, the L-HDAg interact with HBsAg to assemble new virions.

At this time there is no available therapy for hepatitis delta, which makes necessary the development of new, more effective and safe therapies. The need to find new therapeutic options led to the development of drugs targeting specific molecules in the delta virus cycle. This is the case of the prenylation mechanism of L-HDAg, catalyzed by cellular enzymes of the farnesyltransferase group. In this way, inhibitors of this cellular enzyme may constitute a promising therapeutic approach to HDV-induced infection.

The need to find safe and efficient therapeutic options, led us to develop a study to evaluate the therapeutic potential of farnesyltransferase inhibitors, such as the FTI-277, compounds A and B in a Huh7D12 cell line. We evaluated the impact in terms of cell viability and correlated the ability of these drugs to intervene in the expression of the HDV viral genome. We also evaluated the action of these inhibitors on the expression of oncogenes associated with the development of CHC.

For this purpose, Huh7D12 cells were incubated for 48 hours with rising concentrations of FTI-277, compounds A and B. Cellular viability was assessed by use of the *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit* and the expression levels of HDV genomic RNA and oncogenes (STAT3, NF- $\kappa$ B, PIM1, BMP5, CDK2) by the PCR reaction using the specific primers.

Analysis of effects in terms of cell viability has shown that compounds A and B are less toxic to cells on Huh7D12 cell line than the commercial inhibitor FTI-277 at the same drug concentrations. Compounds A and B, like the commercial drug FTI-277, have also been shown to have the same effect on the HDV genomic RNA and on the oncogenes STAT3 and NF- $\kappa$ B, but with less interference in cell viability, which may contribute to improving therapeutic efficacy with decreased toxicity and side effects.

The results obtained in this work, showed that the farnesyltransferase inhibitors used in this study may constitute a promising new therapeutic approach in the treatment of chronic delta hepatitis and as suppressors of carcinogenic processes.

**Key-words:** hepatitis delta virus; prenylation; farnesyltransferase inhibitor; hepatocellular carcinoma; oncogene

## Índice

<b>1. Introdução geral: O vírus da hepatite delta</b>	<b>1</b>
<b>1.1 O vírus da hepatite delta</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Biologia</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1.1 O agente viral</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.2 Ciclo de replicação do HDV</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2 Patologia</b>	<b>11</b>
<b>1.1.3 Transmissão e epidemiologia</b>	<b>14</b>
<b>1.1.4 Tratamento</b>	<b>17</b>
<b>1.1.5 Considerações finais</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1 Objetivos gerais</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Objetivos específicos</b>	<b>21</b>
<b>2. Materiais e métodos</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Linhas celulares</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Fármacos</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Ensaio da viabilidade celular</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Análise dos mecanismos de ação dos fármacos em teste: FTI-277, compostos A e B, e Myricitrin</b>	<b>26</b>
<b>2.4.1 Extração e quantificação de RNA</b>	<b>27</b>
<b>2.4.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA. A reação de transcrição reversa (RT)</b>	<b>28</b>
<b>2.4.3 Reação em cadeia de polimerase – PCR</b>	<b>28</b>
<b>2.4.4 Eletroforese em gel de agarose</b>	<b>30</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Síntese de compostos derivados de FTI-277 e análise dos efeitos em termos de viabilidade celular</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Efeito dos inibidores de farnesil-transferases na expressão do RNA genómico do HDV</b>	<b>35</b>



<b>3.3</b> Efeito dos inibidores de farnesil-transferases na expressão de oncogenes.....	38
<b>3.3.1</b> Influência de FTI-277 e dos compostos A e B nos níveis de expressão STAT3 e NF-kB.....	38
<b>3.3.2</b> Influência de FTI-277 e dos compostos A e B nos níveis de expressão PIM1, BMP5 e CDK2.....	40
<b>4.</b> Discussão e conclusões.....	44
Referências bibliográficas.....	55

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Representação esquemática das três espécies de RNA do HDV .....	4
<b>Figura 1.2</b> Representação esquemática da partícula HDV .....	5
<b>Figura 1.3</b> Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em S-HDAg e L-HDAg. ....	6
<b>Figura 1.4</b> Prevalência mundial do HDV e distribuição geográfica dos genótipos.....	16
<b>Figura 2.1</b> Representação das estruturas químicas do fármaco FTI-277, do composto A e do composto B .....	25
<b>Figura 2.2</b> Esquema da placa <i>multiwell</i> de 96 poços .....	26
<b>Figura 3.1</b> Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular.....	33
<b>Figura 3.2</b> Representação da placa de 96 poços após incubação durante 4h com resazurina, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular .....	34
<b>Figura 3.3</b> Gráfico ilustrativo dos valores médios do índice de viabilidade celular das células Huh7D12.....	35
<b>Figura 3.4</b> Influência de FTI-277 (painel A) e Myricitrin (painel B) nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV .....	37
<b>Figura 3.5</b> Influência dos compostos A (painel A) e B (painel B) nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV .....	37
<b>Figura 3.6</b> Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito de STAT3 .....	39
<b>Figura 3.7</b> Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito de NF-kB.....	40
<b>Figura 3.8</b> Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito PIM1 .....	42
<b>Figura 3.9</b> Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito BMP5 .....	43
<b>Figura 3.10</b> Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito CDK2 .....	43

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 2.1</b> As concentrações dos fármacos e o volume de DMSO usados .....	27
<b>Tabela 2.2</b> Lista dos primers utilizados no ensaio de PCR.....	29
<b>Tabela 2.3</b> Ciclos de temperatura e respetiva duração usados nas reações de PCR .....	29

## Abreviaturas

aa – aminoácido

ADAR – deaminase de adenosina de RNA

Akt – proteína cinase B (ou PKB)

ALT – alanina-transaminase

BMP – proteína morfogénica do osso (*bone morphogenetic protein*)

BMP5 – proteína morfogénica do osso 5

bp – par de bases

CDK2 – *cyclin-dependent kinase 2*

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CHC – carcinoma hepatocelular

CKII – cinase da caseína II

cm – centímetro

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CXXX – C-cisteína, X-qualquer outro aminoácido

dATP – trifosfato de adenina

dCTP – trifosfato de citosina

dGTP – trifosfato de guanina

DMSO – dimetilsufóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – trifosfato de desoxirribonucleótido

dTTP – trifosfato de tirosina

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ERK1 – *extracellular signal-regulated kinase 1*

ERK2 – *extracellular signal-regulated kinase 2*

*et al* – *et alia*

FBS – soro bovino fetal

FTI – inibidor de farnesil-transferase

g – grama

h – hora

HBsAg – antígenos de superfície do HBV

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C  
HDAg – antígeno delta  
HDV – vírus da hepatite D  
HepG2 – linha celular de carcinoma hepatocelular  
HSPG – proteoglicano de sulfato de heparano  
Huh7 – linha celular de carcinoma hepatocelular  
I $\kappa$ B – inibidor do NF- $\kappa$ B  
I $\kappa$ B $\alpha$  – inibidor do NF- $\kappa$ B alfa  
INF-PEG – interferão conjugado com polietilenoglicol  
INF- $\alpha$  – interferão alfa  
K(p)b – Kilo (pares) de bases =  $10^3$  (pares) de bases  
kDa – Kilo (Daltons) =  $10^3$  Daltons  
L-HBsAg – forma grande dos antígenos de superfície do HBV  
L-HDAg – forma grande do antígeno delta  
m – mili, prefixo que designa  $10^{-3}$   
MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio  
M-HBsAg – forma média dos antígenos de superfície do HBV  
MIU – milhões de unidades  
ml – mililitro  
mM – milimolar  
mm – milímetro  
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro  
NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
NES – sinal de exportação nuclear  
NF- $\kappa$ B – ativador do fator nuclear kappa B (*factor nuclear kappa*)  
NLS – sinal de localização nuclear  
nm – nanometro =  $10^{-9}$  metros  
NOX – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina - oxidase (NADPH oxidase)  
nt – nucleótidos  
NTCP – polipeptídeo de cotransporte taurocolato de sódio  
°C – graus Celcius

OLIG – sinal de oligomerização

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – grelha de leitura aberta

PBS – solução salina tamponada por fosfatos

PCR – reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

PEG – polietilenoglicol

PKC – proteína cinase C (*protein cinase C*)

PKCi – inibidor da proteína cinase C (*protein cinase C inhibitor*)

PKC- $\alpha$  – proteína cinase C alfa

PKR – proteína cinase R

PML – *promyelocytic leukemia*

pol I – polimerase I

pol II – polimerase II

pol III – polimerase III

poli(A) – cauda poliadenilada

*primers* – oligonucleótidos iniciadores

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real (*real time quantitative - PCR*)

RBD – domínio de ligação a RNA

RNA – ácido ribonucleico

RNases – ribonucleases

RNP – ribonucleoproteína

ROS – espécies reativas de oxigénio

RE – retículo endoplasmático

rpm – rotações por minuto

RT – reação de transcrição reversa (*reverse transcription*)

RT-PCR – PCR via transcriptase reversa (*reverse transcription - PCR*)

S-HBsAg – forma pequena dos antígenos de superfície do HBV

S-HDAg – forma pequena do antígeno delta

STAT – *signal transducers and activators of transcription*

STAT3 – *signal transducers and activators of transcription 3*

TAE – Tris-acetato-EDTA

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

U – unidade

UAG – codão stop (*amber stop codon*)

UGG – codão triptofano (*tryptophan codon*)

UV – ultravioleta

v/v – percentagem volume por volume

μ – micro, prefixo que designa  $10^{-6}$

μg – microgramas

μl – microlitro

μM – micromolar

# **1. Introdução geral:**

## **O vírus da hepatite delta**



## 1.1 O vírus da hepatite delta

O vírus da hepatite delta (HDV) é o agente etiológico da forma mais grave da hepatite viral em humanos e é considerado como um dos mais patogénicos e mais agressivos entre os vírus hepatotrópicos (Rizzetto *et al.*, 1977; Ponzetto *et al.*, 1987). Foi descoberto casualmente por Mario Rizzetto no ano de 1977 durante a observação de biópsias de fígado de indivíduos portadores da doença hepática crónica (Rizzetto *et al.*, 1977). As biópsias de alguns pacientes com marcadores de infeção com o vírus da hepatite B (HBV) apresentavam um antígeno nuclear desconhecido até à data, ao qual posteriormente foi atribuída a denominação de antígeno delta (HDAg). Apesar de inicialmente ser considerado como específico do HBV, mais tarde por meio das infeções experimentais, foi demonstrado que o HDAg, em associação com uma molécula de RNA, forma uma porção interna de um vírus distinto ao do HBV (Rizzetto *et al.*, 1980).

O agente infeccioso HDV, do qual faz parte o HDAg, não codifica as proteínas do seu invólucro mas utiliza as proteínas de superfície do HBV (HBsAg) para completar o seu ciclo biológico, nomeadamente para o empacotamento das partículas infecciosas (Chen *et al.*, 1986; Taylor, 1992). Desta forma foi evidenciada a associação clínica existente entre os dois vírus com a necessidade da presença de HBV para o estabelecimento de uma infeção transmissível pelo HDV (Sureau *et al.*, 1993; Shirvani-Dastgerdi & Tacke, 2015). Na natureza o HDV é encontrado em indivíduos infetados com o HBV, sendo o ser humano o único reservatório conhecido, e como não é considerado um vírus hepatotrópico autónomo é visto como um vírus satélite de HBV (Rizzetto *et al.*, 1980; Taylor, 2015).

Em 1996, o HDV foi apresentado como sendo o único representante do género *Deltavírus*, devido à sua particular dependência de HBV e às características estruturais do seu genoma, as quais não se assemelham a nenhum agente infeccioso animal conhecido (Gerin, 1994; Murphy, 1996). O género *Deltavírus*, até à data, é um género separado, não sendo classificado taxonomicamente em nenhuma família de vírus (Gerin *et al.*, 2001).

## 1.1.1 Biologia

### 1.1.1.1 O agente viral

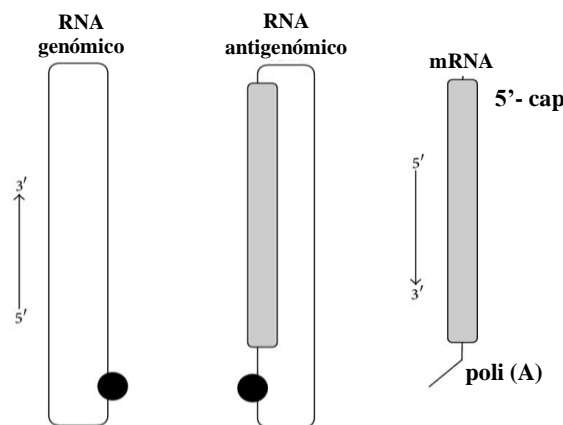
O vírus da hepatite delta apresenta-se biologicamente diferente entre os vírus animais conhecidos assemelhando-se porém com os viróides, grupo de agentes patogênicos infecciosos das plantas, no que respeita à formação de estruturas de RNA similares com bastonetes, assim como o seu reduzido tamanho e o modo de replicação (Taylor, 2014; Lempp & Urban, 2017). Porém, contrariamente dos viróides, o HDV possui um genoma maior, com capacidade de codificar o seu próprio antígeno (Flores *et al.*, 2016).

O virião do HDV apresenta uma estrutura esférica, com um diâmetro de cerca de 36 nm, revestido externamente pelas proteínas de superfície do HBV e por lípidos celulares (He *et al.*, 1989). As três formas de HBsAg são traduzidas a partir de uma única grelha aberta de leitura (ORF), com início em três códons diferentes. Estas proteínas, de acordo com o seu tamanho, são designadas como pequena (S-HBsAg), média (M-HBsAg) e grande (L-HBsAg), e encontram-se na proporção 95:5:1, respetivamente (Sureau, 2006; Pascarella & Negro, 2010). A proteína S-HBsAg é formada por 226 aminoácidos, que constituem o domínio S, a forma média é ampliada por uma sequência de 55 aminoácidos de um domínio pré-S2, enquanto a proteína L-HBsAg possui um domínio pré-S1 localizado a montante do domínio pré-S2, com 108-119 aminoácidos (Hourieux *et al.*, 1998; Sureau, 2006).

A parte interna do virião corresponde ao genoma do HDV associado num complexo ribonucleoproteico (RNP), com múltiplas cópias de antígeno delta. O genoma do HDV consiste numa molécula de RNA circular de cadeia simples, com aproximadamente 1.7 Kb de comprimento e de polaridade negativa (Saldanha *et al.*, 1990; Gudima *et al.*, 2002). Esta molécula de RNA possui um elevado grau de complementaridade de bases (cerca de 74%), o que contribui para a ocorrência no interior da molécula de múltiplos emparelhamentos formando uma estrutura em forma de bastonete não ramificado (Kuo *et al.*, 1988; Niro & Smedile, 2012).

Durante o processo de replicação, além do RNA genômico, designação atribuída ao RNA do HDV detetado nos viriões, encontram-se também outras moléculas de RNA viral, o RNA antigenômico e o RNA mensageiro. As moléculas de RNA antigenômico são formadas no interior das células hepáticas como produto da replicação do HDV, são de polaridade positiva e partilham as mesmas características do genômico, sendo-lhe complementares. Ao contrário do RNA genômico, o antigenômico não é empacotado nas partículas virais e encontra-se presente nas células do hospedeiro em níveis inferiores relativamente ao genômico (Chen *et al.*, 1986).

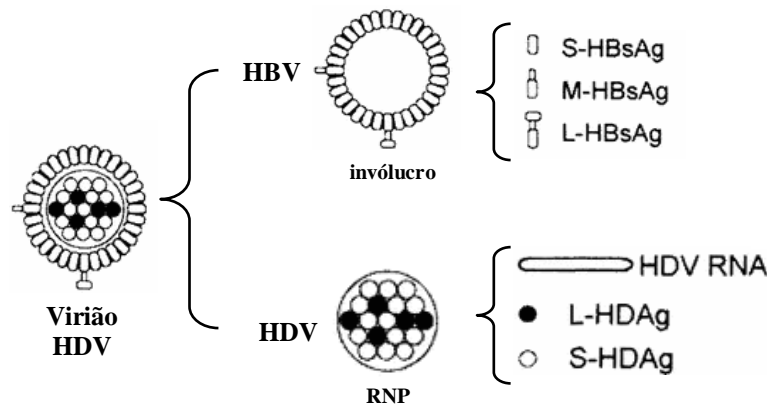
O genoma de HDV possui uma única ORF da qual derivam duas formas distintas de uma única proteína, o antigénio delta (Rizzetto, 2016). Na fase inicial da replicação do HDV são transcritos a partir do RNA genômico, mRNAs com aproximadamente 0.8 Kb que codificam para uma das formas do HDag, a forma pequena (S-HDAg; figura 1.1). O S-HDAg é uma proteína com 195 aminoácidos e cerca de 24 kDa (Chang *et al.*, 1988; Kuo *et al.*, 1988).



**Figura 1.1: Representação esquemática das três espécies de RNA do HDV.** O RNA genômico do HDV é um RNA circular de cadeia simples com cerca de 1700 nucleótidos. Forma uma estrutura em bastonete não ramificado devido ao emparelhamento intramolecular de bases. O RNA antigenômico do HDV é o complementar exato do RNA genômico, e ambos possuem atividade ribozímica com domínios bem definidos (círculo preto). O RNA antigenômico possui uma ORF para o antigénio delta (retângulo cinzento), no entanto, o HDag é traduzido a partir de uma outra espécie de RNA, o mRNA. O mRNA possui 800 nt e possui uma estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

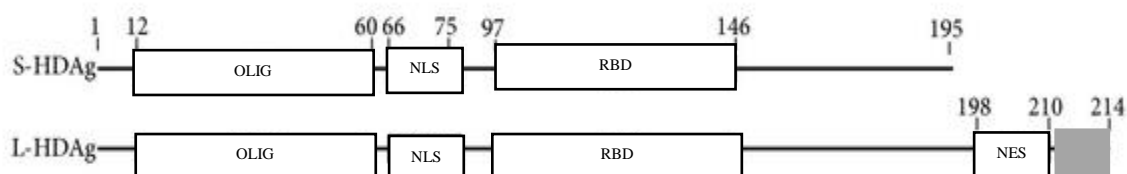
Numa fase mais tardia, algumas moléculas de RNA antigenômico sofrem *RNA editing*, que consiste na conversação do codão stop UAG para o codão triptofano UGG estendendo a grelha de leitura (Casey & Gerin, 1995). Estes RNAs modificados, ao

serem transcritos, dão origem a moléculas de mRNAs da tradução das quais resulta uma variante do HDAg, o antígeno delta grande (L-HDAg) com 214 resíduos de aminoácidos (27 kDa; figura 1.2). Esta modificação pós-transcricional do RNA antigenômico é levada a cabo por deaminases de adenosina celulares que atuam em RNAs de cadeia dupla (ADAR; Sato *et al.*, 2001; Wong & Lazinski, 2002).



**Figura 1.2: Representação esquemática da partícula HDV.** O virião é constituído por dois tipos de elementos: i) o invólucro viral é constituído por proteínas de superfície do HBV, as proteínas S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg; ii) a ribonucleoproteína (RNP), que compreende uma molécula de RNA genômico circular associado aos antígenos delta, S-HDAg e L-HDAg (adaptado de Sureau, 2006).

As duas formas de antígeno delta possuem domínios funcionais específicos, incluindo o sinal de localização nuclear (NLS) que consiste numa sequência bipartida rica em resíduos básicos, os domínios de ligação ao RNA (RBD) que compreendem duas sequências ricas em arginina, e domínios semelhantes a fechos de leucina (Lee *et al.*, 1993). O L-HDAg apresenta ainda, nos 19 aminoácidos adicionais da extremidade C-terminal, um eventual sinal de exportação nuclear (NES) e um sinal de farnesilação (CXXX box) que funciona como substrato para a atuação das farnesil-transferases celulares (Glenn *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2001; figura 1.3). Estas enzimas celulares catalisam o processo de farnesilação, uma das formas de prenilação, que ocorre em três etapas. Inicialmente é adicionado um grupo farnesil de 15 carbonos ao resíduo de cisteína. De seguida, os três aminoácidos C terminais são removidos e, por fim, ao resíduo de cisteína é adicionado um grupo metil no grupo carboxilo, tornando mais lipofílica a proteína modificada (Maltese, 1990; O'Malley & Lazinski, 2005; Shen *et al.*, 2015).



**Figura 1.3: Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em S-HDAg e L-HDAg.** Na região N-terminal, ambas as proteínas contêm um domínio de oligomerização (OLIG; aa 12-60). Segue-se um domínio de sinalização nuclear (NLS; aa 66-75) e a região central apresenta um domínio de ligação ao RNA (RBD; aa 97-146). O L-HDAg apresenta ainda na extremidade C-terminal um sinal de exportação nuclear (NES; aa 198-210) e um sinal de farnesilação, a CXXX box (retângulo cinzento), (adaptado de Alves *et al.*, 2013).

Apesar das semelhanças evidentes ao nível dos domínios funcionais entre as duas isoformas do antígeno delta, estes desempenham funções distintas no ciclo replicativo do vírus. O S-HDAg é necessário na replicação do RNA, enquanto o L-HDAg é requerido para a inibição da replicação e transcrição, aceleração de formação dos novos viriões e também interação com os HBsAgs (Chao *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994).

### 1.1.1.2 Ciclo de replicação do HDV

A compreensão sobre a fixação do HDV na superfície dos hepatócitos e a sua entrada na célula hospedeira permaneceu desconhecida há muito tempo, devido à inexistência de modelos experimentais que poderiam demonstrar todas as etapas do ciclo replicativo (Yan *et al.*, 2012).

O invólucro do HDV, em termos de composição proteica, é idêntico ao do vírus auxiliar, o que pressupõe que o HDV e o HBV usam os mesmos recetores para entrar na célula. Os ensaios experimentais de Sureau e colaboradores (1993) demonstraram a importância que a forma L do HBsAg possui na interação de baixa afinidade com os recetores celulares da superfície hepática, sendo o proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG) o primeiro recetor para esta partícula (Sureau *et al.*, 1993; Shulze *et al.*, 2007; 2010). Contudo, os estudos de Yan e colaboradores (2012) demonstraram que um

cotransportador de ácido biliar, o polipeptídeo de cotransporte taurocolato de sódio (NTCP) possui uma interação de alta afinidade com a região pré-S1 do L-HBsAg. Isto foi demonstrado através de silenciamento do gene que expressa este cotransportador, mostrando assim a inibição da infecção por HBV e HDV (Yan *et al.*, 2012). Neste contexto, a linha celular HepG2 complementada com NTCP tornou-se uma ferramenta valiosa para os estudos das infecções virais *in vitro* (Yan *et al.*, 2015).

A replicação do genoma do vírus do HDV é totalmente independente de quaisquer funções do HBV. Após a entrada do vírus delta nos hepatócitos e posterior descapsidação, as ribonucleoproteínas são transportados para o núcleo das células (Chou *et al.*, 1998). Este transporte nuclear ocorre sobretudo devido à presença dos domínios NLS nos antígenos de superfície das partículas virais (Tavanez *et al.*, 2002). Como os HDAs e as RNPs do HDV apresentam uma distribuição quase exclusivamente nuclear deduz-se que a replicação tem lugar no núcleo das células.

Quer o RNA genómico quer o RNA antígenómico possuem atividade ribozímica que catalisa reações de auto-clivagem de RNA do HDV em locais específicos (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1998; Been, 2006). Qualquer mutação que interfira neste processo *in vitro* está igualmente associada à perda de capacidade replicativa do vírus *in vivo*. O facto do genoma do HDV ser circular e a replicação do vírus depender da atividade ribozímica de ambos os RNAs, sugere que a replicação segue um mecanismo de círculo rolante, assemelhando-se ao aceite para os viróides das plantas (Macnaughton *et al.*, 1993; Lazinski & Taylor, 1995). Este modelo é apoiado pela presença de espécies de RNA do HDV com tamanhos superiores, múltiplos de 1.7 Kb em biópsias hepáticas e células em cultura, que provavelmente corresponde às formas intermediárias de replicação (Chen *et al.*, 1986). De acordo com o modelo de círculo rolante, o RNA genómico serve de molde para a síntese das moléculas multiméricas de RNA antígenómico que são auto-clivadas em intervalos precisos, libertando monómeros de RNA (Kuo *et al.*, 1988; Reid & Lazinski, 2000). Estes monómeros de polaridade oposta, por ação de ligases de RNA celulares, são convertidos em antígenomas circulares, que por sua vez servem de molde para a síntese de novos transcritos de RNA genómico por um mecanismo idêntico (Alves *et al.*, 2013). Todavia, a estratégia de replicação utilizada por HDV antevê-se mais complexa. O genoma do HDV codifica

uma proteína e, conseqüentemente, o modelo proposto para a replicação tem que considerar também a transcrição de mRNAs.

No núcleo das células, o RNA antigenómico do HDV é utilizado como molde para a síntese de RNAs genómicos multiméricos, bem como para a transcrição de mRNAs. Estes dois processos, segundo o modelo proposto por Hsieh e Taylor (1991), encontram-se separados temporalmente, sendo a síntese de mRNA poliadenilado o primeiro evento do ciclo replicativo do HDV (Hsieh & Taylor, 1991). Posteriormente, por um mecanismo que envolve o S-HDAg e a capacidade dos novos transcritos assumirem a conformação do tipo bastonete não ramificado, o sinal de poliadenilação dos mRNAs é silenciado. Permite-se assim, a continuação da transcrição para além do sinal de poliadenilação e a produção de transcritos genómicos multiméricos que são depois processados (Hsieh *et al.*, 1994). Contudo, o modelo apresentado demonstra algumas restrições, na medida em que, a síntese de mRNA que codifica para as duas formas de antigenógeno delta, ocorrer apenas na fase inicial da replicação, não sendo favorável a produção de L-HDAg. Os RNAs que servem de molde à transcrição de mRNAs que codificam o L-HDAg surgem em fases mais tardias do ciclo, resultantes de um processo de *editing* do RNA antigenómico. Como consequência da inibição precoce do sinal de poliadenilação, o L-HDAg não seria sintetizado, logo o ciclo de replicação não seria completado e a propagação da infeção seria interrompida.

Contrariando a ideia da transcrição de mRNA ocorrer apenas no início do ciclo replicativo, Modahl e Lai (1998) mostraram que a síntese de mRNA poli(A) ocorre em paralelo com o RNA antigenómico e que a acumulação do mRNA não é inibida com o aumento dos níveis de expressão de HDAg. Estes resultados mostram-se compatíveis com o ciclo replicativo produtivo (Modahl & Lai, 1998).

Um dos aspetos interessantes do ciclo replicativo do HDV consiste no facto deste não codificar nenhuma RNA polimerase e depender da maquinaria enzimática da célula hospedeira para a replicação do seu genoma. As células mamíferas não codificam para RNA polimerases dependentes de RNA, o que pressupõe que o HDV possui capacidade de redirecionar uma RNA polimerase que, regularmente, depende de DNA para transcrever genomas virais (Fu & Taylor, 1993).

A RNA polimerase II celular (RNA pol II) foi, desde cedo, implicada na transcrição de mRNA e na síntese de RNA genómico (Fu & Taylor, 1993). Vários estudos baseados

em resistência a  $\alpha$ -amanitina, conhecida por bloquear a transcrição mediada pela RNA pol II, mostraram que a transcrição de mRNA e a síntese do RNA genómico são especificamente inibidas na presença desta droga (Fu & Taylor, 1993; Modahl *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2008). Além disso, os mRNAs são modificados na extremidade 5' pela adição da estrutura *cap* e possuem uma cauda poli(A) na extremidade 3', características comuns dos transcritos produzidos pela RNA polimerase II (Hsieh *et al.*, 1990).

Se por um lado parece ser consensual que a RNA polimerase II é responsável pela transcrição de mRNAs e pela síntese de genomas do HDV, há controvérsia no que respeita à identidade de RNA polimerase envolvida na síntese de RNA antigenómico.

A síntese de RNA antigenómico é resistente a  $\alpha$ -amanitina, sugerindo que uma enzima celular diferente (a RNA pol I ou pol III) é responsável pela produção deste intermediário replicativo. Os estudos de Li e colaboradores (2006) demonstraram que a formação de RNA genómico é sensível as doses de  $\alpha$ -amanitina (10  $\mu$ g/ml) e tem lugar no nucleoplasma em associação com os corpos PML, enquanto a síntese de novas moléculas de RNA antigenómico é resistente a  $\alpha$ -amanitina e ocorre nos nucléolos (Li *et al.*, 2006). Ainda, estes autores observaram que na presença de um anticorpo específico contra um fator de iniciação de RNA polimerase I, reduz a síntese de RNA antigenómico em 80% (Li *et al.*, 2006). Tendo em conta estes resultados, a hipótese de que a replicação de RNA do HDV é realizada com a participação de pelo menos duas RNA polimerases é cada vez mais aceite.

É de realçar a importância da presença da forma pequena do antígeno delta no decurso de replicação do HDV. Apesar do mecanismo através do qual esta proteína promove a replicação não se encontrar clarificado, uma explicação possível reside no facto do S-HDAg poder funcionar como um fator de transcrição e consequentemente regular a transcrição mediada pela RNA pol II. Estudos conduzidos por Yamaguchi e colaboradores (2001) demonstraram que o S-HDAg interage diretamente com a RNA polimerase II, através de um domínio localizado na sua extremidade C-terminal. Além disso, os resultados obtidos por estes autores sugerem que o impedimento da ligação do S-HDAg à RNA polimerase II torna a proteína incapaz de suportar a replicação do RNA do HDV (Yamaguchi *et al.*, 2001). Do mesmo modo obtiveram-se resultados semelhantes após a redistribuição do S-HDAg do nucleoplasma para os nucléolos das



células. A incapacidade de ativar a replicação do genoma do HDV deve-se ao facto do S-HDAg com localização nucleolar não estabelecer uma interação física com RNA polimerase II (Huang *et al.*, 2008).

Encontra-se documentado que, além da RNA polimerase II, o S-HDAg interage com outros fatores celulares. Nestes incluem-se a histona H1, o fator de transcrição DIPA, a proteína nucleolar B23, o fator de transcrição YY1, entre outros. Embora desempenhem funções diversas na célula hospedeira, estes fatores celulares parecem modular de certo modo a replicação do HDV (Greco-Stewart & Pelchat, 2010).

O S-HDAg também poderá ser alvo dos processos pós-traducionais tais como metilação, acetilação e fosforilação. Alguns estudos mencionaram a existência de uma relação entre a fosforilação do S-HDAg e a replicação viral, atribuindo um papel importante à cinase da caseína II (CKII) neste processo, apesar da falta de evidências diretas. A inibição da atividade desta cinase diminui a fosforilação do S-HDAg e causa uma redução drástica na acumulação de RNA do HDV (Yeh *et al.*, 1996). A mutação da serina 2 do S-HDAg, um dos locais consenso da CKII, tem um impacto semelhante na replicação do genoma do HDV à utilização de inibidores de fosforilação, consolidando a ideia desta cinase participar no ciclo replicativo.

O S-HDAg possui um resíduo de serina altamente conservado na posição 177 que se encontra fosforilada *in vivo* e é substrato da proteína cinase R (PKR; Chen *et al.*, 2002). Estudos de mutagénesis dirigida mostraram a importância da fosforilação do resíduo de serina 177 do S-HDAg para a síntese de RNA genómico do HDV (Mu *et al.*, 2001). Também foram identificadas duas cinases, a ERK1 e ERK2, capazes de catalisar a fosforilação e tal como acontece com a PKR, a inibição da sua atividade é acompanhada de uma redução significativa do estado de fosforilação do S-HDAg. Porém, a atividade destas cinases tem um efeito oposto na replicação do genoma do HDV. Enquanto a supressão da PKR está associada a um aumento de replicação do HDV, a inibição das cinases ERK1 e ERK2 inibe a replicação (Chen *et al.*, 2002; 2008). Por outro lado, a ativação das cinases ERK1/2 causa um aumento na acumulação de RNA genómico e uma redução de RNA antigenómico (Chen *et al.*, 2008).

Embora os mecanismos moleculares pelos quais as modificações pós-traducionais do S-HDAg participam na regulação da replicação do HDV estejam pouco esclarecidos, alguns estudos têm suportado a ideia que a fosforilação do resíduo de serina 177 do S-

HDAg modula a interação entre o S-HDAg e a RNA polimerase II, potenciando a replicação do HDV (Chen *et al.*, 2008). Estes resultados reforçam a ideia que a replicação do HDV é regulada por modificações pós-traducionais que ocorrem ao nível do S-HDAg.

Outro aspeto interessante do ciclo de replicação do HDV são os mecanismos moleculares associados à formação das partículas virais. Tal como foi mencionado, o L-HDAg é importante para a interação das RNPs do HDV com os HBsAgs. Contudo, as RNPs e os HBsAgs encontram-se em compartimentos celulares distintos. Enquanto as RNPs do HDV se localizam no núcleo da célula hepática, os HBsAgs são exclusivamente detetados no citoplasma dos hepatócitos infetados (Bichko *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2009). Através dos ensaios de heterocariontes foi demonstrado que as RNPs do HDV são transportadas transitoriamente entre o núcleo e citoplasma, independentemente da presença de HBsAgs no citoplasma celular. Na ausência de HBsAgs, as RNPs do HDV são re-importadas para o núcleo através dos NLS presentes em ambos os HDAgs (Tavanez *et al.*, 2002). Na ausência de RNA do HDV, as isoformas de HDAg são exclusivamente detetadas no núcleo e não são exportadas para o citoplasma celular. Contrariamente, na ausência de HDAg, o RNA genómico é predominantemente detetado no citoplasma, sugerindo que os sinais de exportação das partículas virais se encontram no RNA do HDV (Tavanez *et al.*, 2002). Quanto ao empacotamento das partículas virais, ainda não está totalmente desvendado o mecanismo de interação entre as RNPs do HDV e HBsAgs. No entanto, é reconhecida a importância da modificação pós-traducional do L-HDAg neste processo, nomeadamente a prenilação da cisteína 211 (Hwang & Lai, 1993; Huang & Lo, 2014).

### 1.1.2 Patologia

O HDV é um agente viral altamente patogénico responsável pela forma de doença hepática mais grave. As alterações patológicas detetáveis apresentam um padrão semelhante ao que é observável nas outras formas das hepatites virais, daí a aparência e

difícil distinção do ponto de vista histológico. O quadro patológico comum compreende, nomeadamente, a inflamação e necrose hepatocelular (Rizzetto *et al.*, 1983).

A evolução do quadro clínico da infeção provocada por HDV poderá ser bastante variável, causando hepatite crónica ou aguda. Após um período de incubação, que geralmente varia de 21 a 49 dias, observam-se os primeiros sintomas os quais compreendem fadiga, letargia, anorexia e náuseas. Posteriormente surgem os sinais de icterícia, a pele adquire o tom amarelado, a urina torna-se escura e as fezes claras, enquanto os níveis de bilirrubina sobem (Rizzetto *et al.*, 1983; Farci & Niro, 2012). Nos casos mais graves, as infeções agudas poderão evoluir para a forma mais severa da hepatite, levando à uma possível falência hepática (Govindarajan *et al.*, 1984; Purcell *et al.*, 1990).

Como referido anteriormente, o HDV é considerado um vírus satélite do HBV. A associação biológica entre estes dois vírus deve-se ao facto do envelope viral do HDV ser composto pelos antígenos de superfície do HBV, o que explica a necessidade da presença do HBV para haver infeção produtiva e transmissão do HDV. A infeção com o HDV pode assim ser estabelecida de duas formas, em simultâneo com o HBV (co-infeção) ou posteriormente em indivíduos portadores crónicos de HBV (super-infeção; Hsieh *et al.*, 2006).

No caso de infeção simultânea, co-infeção aguda, em alguns casos poderá ser observada a interferência viral, tendo o HDV a capacidade de inibir a replicação do HBV o que poderá contribuir para a resolução espontânea da hepatite resultante. O HDV inibe a replicação do genoma do HBV com a posterior redução da síntese do RNA pré-genómicos e dos mRNAs que codificam HBsAgs, o que em 95% dos casos poderá levar à uma recuperação completa de infeção e eliminação dos vírus. Contudo, a dominância viral ao longo do decurso da doença pode alterar ou alternar (Wu *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1993).

O quadro clínico, no caso de uma co-infeção aguda, é semelhante às outras formas de hepatites virais, ainda que em alguns casos é mais grave. A hepatite aguda demonstra habitualmente evolução benigna, caracterizando-se pela elevação bifásica dos níveis das aminotransferases e bilirrubina. Este curso clínico bifásico relaciona-se com expressão sequencial dos dois vírus, em que o primeiro pico de aumento dos níveis corresponde à replicação do HBV e o segundo do HDV (Rizzetto *et al.*, 1987). Porém, poderá ocorrer

um agravamento da sintomatologia com possível desenvolvimento das formas de hepatite severa ou mesmo fulminante, devido às alterações provocadas por HBV em conjunto com o aumento da síntese do HDV (Fonseca *et al.*, 1992; Rizzetto *et al.*, 1977). Apesar da infecção pelo HDV ser responsável pela progressão da doença hepática, a persistência da replicação do HBV, ainda que mínima, constitui um fator essencial na evolução da patogénese na hepatite crónica (Lozano *et al.*, 1994). Assim, no caso de co-infecção em que o indivíduo é infetado pela mesma via, a evolução do quadro clínico depende maioritariamente da maior ou menor gravidade do processo causado pelo vírus B. A co-infecção raramente evolui para a cronicidade, sendo que a taxa de cronicidade em indivíduos adultos não ultrapassa os valores de 5%, que é semelhante à atribuída no caso de infecção por hepatite B isolada (Hsieh *et al.*, 2006).

No caso de super-infecção pelo HDV em portadores de HBsAgs, sintomáticos ou assintomáticos, o prognóstico é pior. A infecção prévia pelo HBV proporciona ao HDV condições ideais para a sua replicação intensa, com lesão hepática mais grave (Gerin *et al.*, 2001). Nos indivíduos com a doença hepática crónica a super-infecção agrava o quadro clínico, histológico e bioquímico (Rizzetto *et al.*, 1997). Consequentemente, o prognóstico revela-se diferente em comparação com a co-infecção e a taxa de cronicidade é cerca de 80%, dos quais 40% dos casos evoluem para a cirrose, sendo esta taxa 3 vezes superior à registada para o HBV e HCV (Hsieh *et al.*, 2006). Segundo Fattovich e colaboradores (2000), a super-infecção pelo HDV aumenta 3 vezes o risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) e 2 vezes a mortalidade em pacientes com cirrose compensada (Fattovich *et al.*, 2000).

O CHC é o tumor hepático primário com origem nos hepatócitos. Mundialmente é o 6º tumor maligno mais frequente e é a 3ª causa mais comum de morte por cancro (Lope *et al.*, 2012). A elevada taxa de mortalidade ocorre devido ao diagnóstico tardio e à ausência de uma terapia eficaz. No que diz respeito aos fatores de risco, os vários estudos apontam que as doenças infecciosas, hereditárias ou metabólicas desempenham um papel importante na patogénese da doença, sendo o principal fator a cirrose hepática (Llovet *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2011). Cirrose é considerada uma situação pré-cancerígena e compreende um processo difuso de fibrose e formação de nódulos, acompanhando-se habitualmente de necrose hepatocelular e multiplicação das células do fígado alteradas (Sangiovanni *et al.*, 2006).

Os mecanismos de desenvolvimento de tumores hepáticos associados ao vírus da hepatite são complexos e envolvem fatores relacionados tanto do vírus em causa como do hospedeiro (Abbas *et al.*, 2015). Os resultados recentes obtidos por Williams e colaboradores (2012) demonstraram a importância do L-HDAg como ativador do fator nuclear kappa B (NF-kB; *factor nuclear kappa*) e da proteína STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*). Estas proteínas têm sido descritas como responsáveis pelos eventos intracelulares relevantes para a patogénese hepática (Aggarwal, 2004; Williams *et al.*, 2012; Chao *et al.*, 2017).

Vários estudos do HDV permitiram estabelecer a relação existente entre a ativação de STAT3 e NF-kB e a sobreprodução das espécies reativas de oxigénio (ROS; Pahl & Baeuerle, 1997; Waris *et al.*, 2002). Os ROS são gerados pelo retículo endoplasmático (RE) como resposta à ativação da NADPH oxidase (NOX). Williams *et al.* (2012) referiram que este aumento de produção de ROS está relacionado com a atividade do L-HDAg, devido ao processo de isoprenilação e capacidade de transporte das RNPs sintetizadas para o RE (Williams *et al.*, 2012). Do mesmo modo, Park e colaboradores (2009) demonstraram que a ativação do NF-kB também poderá ser regulada por L-HDAg via ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; *tumor necrosis factor alpha*; Park *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Transmissão e epidemiologia

Os modos de transmissão do HDV são semelhantes aos mecanismos de transmissão observados no HBV (Alves *et al.*, 2013).

Em zonas endémicas, a via parenteral é considerada a principal forma de transmissão do vírus. Já nas regiões não endémicas, a transmissão ocorre frequentemente entre os utilizadores de drogas injetáveis e ainda entre homossexuais masculinos e prostitutas. Deste modo é evidenciado o facto das relações sexuais e dos contactos com sangue infetado serem os principais meios de transmissão da hepatite delta. Por sua vez, a transmissão vertical relaciona-se diretamente com a infeção provocada por HBV,

ocorrendo em mães portadoras de HBV com sinais serológicos evidentes de replicação viral (Purcell & Gerin, 1996; Fonseca, 1993).

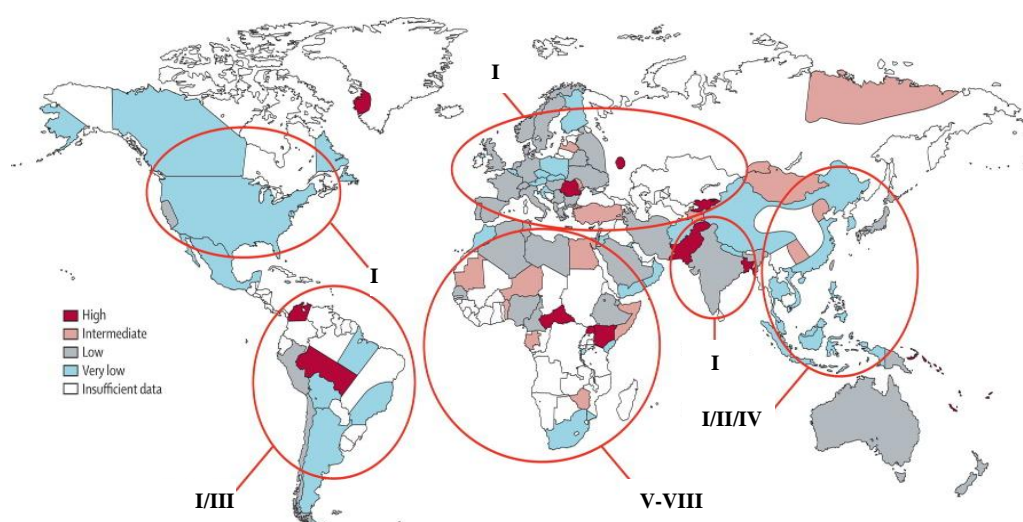
As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que cerca de 400 milhões de indivíduos no mundo são infectados cronicamente com HBV, e destas aproximadamente 20 milhões estão co-infectadas com o HDV (Lozano *et al.*, 2012).

Os estudos epidemiológicos demonstram que a distribuição do HDV é global, mas não uniforme. As regiões que apresentam, a maior prevalência são a bacia do Mediterrâneo, algumas ilhas do Pacífico, bacia do Amazonas, África Ocidental e Central, e Ásia Central (Hsieh *et al.*, 2006). No caso de Amazônia Ocidental, a hepatite delta constitui um problema de saúde pública major, tendo os valores de prevalência ultrapassado 85% em pacientes crônicos (Torres *et al.*, 1996). Apesar de alterações observadas no padrão epidemiológico, a bacia de Amazonas permanece como um importante reservatório para novos surtos da hepatite delta, oferecendo condições sociais, culturais e ambientais que permitem a transmissão da infecção (Manock *et al.*, 2000). Existem, também, zonas que, apesar de serem consideradas endêmicas para o HBV, apresentam taxas reduzidas para o HDV. Esta tendência verifica-se na Ásia, onde apesar da alta prevalência de portadores do HBV na população, a incidência de infecção pelo HDV limita-se a grupos com comportamentos de alto risco (Huo *et al.*, 2003). Algumas regiões no Sul da Europa também são consideradas endêmicas, de acordo com os estudos realizados entre os anos 80 e 90, onde a incidência de infecção por HDV chegou a atingir os 20% (Farci, 2003). Porém, de acordo com estudos epidemiológicos recentes, foi demonstrado que a infecção pelo HDV em portadores crônicos de HBV tem vindo a diminuir. Em Itália por exemplo, registou-se uma redução de prevalência de hepatite delta em cerca de 50% e uma redução significativa da ocorrência de cirrose associada à infecção viral (Gaeta *et al.*, 2000). A tendente redução da taxa de infecção pelo HDV está associada à vacinação em massa contra o HBV em países Europeus, sendo que em Portugal a vacinação contra o HBV faz parte do Plano Nacional de Vacinação desde o ano 2000. A redução da prevalência da hepatite delta na Europa perspetivou a ideia de que a doença seria excluída da lista de doenças endêmicas (Gaeta *et al.*, 2000). Porém, estudos recentes têm demonstrado um ligeiro aumento da prevalência no continente europeu, provavelmente devido ao afluxo populacional oriundo das zonas endêmicas (Manesis *et al.*, 2013).

Em Portugal, apesar de não existirem dados estatísticos recentes em relação a prevalência de hepatite delta na sociedade, é considerada como pouco frequente, atingindo principalmente os grupos de alto risco (Velosa *et al.*, 1993). Estudos realizados nos anos 80 indicam que a prevalência acompanhou o aumento do número de toxicodependentes na sociedade portuguesa, registando-se uma taxa de 17% em portadores crónicos de HBV (Ramalho *et al.*, 1987).

Baseando-se na variabilidade genética do HDV, atualmente, é possível identificar oito tipos de genótipos (Makuwa *et al.*, 2008; figura 1.4).

O genótipo I é mais frequente e encontra-se associado à doença crónica, podendo desencadear progressão rápida para a cirrose. A sua distribuição é mais abrangente, ocorrendo nos Estados Unidos de América, Europa, Médio Oriente e norte de África (Su *et al.*, 2006; Hedrich *et al.*, 2009). O genótipo II ocorre no Japão e Taiwan e causa uma forma da doença relativamente moderada (Wu, 2006). O genótipo III encontra-se associado ao desenvolvimento de hepatites fulminantes na América do Sul (Smedile *et al.*, 1994). Por último, os genótipos IV a VIII têm sido identificados principalmente no continente africano (Makuwa *et al.*, 2009).



**Figura 1.4: Prevalência mundial do HDV e distribuição geográfica dos genótipos.** O genótipo I do HDV é o mais frequente e encontra-se distribuído mundialmente, principalmente na Europa, Médio Oriente, América do Norte. O genótipo II do HDV é observado na Ásia Oriental. O genótipo III ocorre exclusivamente na América do Sul e os genótipos IV-VIII são identificados sobretudo no continente africano (adaptado de Hughes *et al.*, 2011).

### 1.1.4 Tratamento

A vacinação contra o HBV é considerada a melhor forma de redução de prevalência e incidência da infecção pelo HDV. Contudo, a imunização ativa mostra-se eficaz apenas no contexto de co-infecção. No caso de indivíduos portadores crônicos do HBV, residentes em áreas endêmicas de infecção pelo HDV, a imunização ativa não é eficaz e a infecção pelo HDV continua a representar um desafio. A imunização com vacinas de DNA que codificam para o HDVAg e utilização direta de HDVAg não demonstraram ser eficientes quanto a proteção contra infecção pelo HDV (Fiedler & Roggendorf, 2006).

O tratamento da infecção provocada pelo HDV, para além de ter como principal objetivo a eliminação do vírus e a inibição da sua replicação, pretende diminuir os processos inflamatórios crônicos do fígado, reduzindo, deste modo, o risco de desenvolvimento de cirrose ou hepatocarcinoma, aumentando a sobrevida dos doentes.

Na tentativa de obter uma boa resposta clínica à infecção, é importante o diagnóstico antecipado e o início do tratamento precoce, sendo relevante também a dose do fármaco a usar e a duração do tratamento. A resposta ao tratamento é avaliada pela normalização dos valores de alanina-transaminases (ALT; resposta bioquímica), eliminação do RNA do vírus no soro sanguíneo (resposta virológica) e redução dos processos necro-inflamatórios hepáticos (Hoofnagle, 1998; Hsieh *et al.*, 2006).

Opções terapêuticas para infecções crônicas de HDV são escassas, não existindo atualmente uma terapia eficaz para infecções crônicas de HBV/HDV. O interferão- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) constitui a única opção reconhecida para o tratamento da hepatite delta. No entanto, a sua eficácia é discutível (Abbas *et al.*, 2011). Na década de 90, foram realizados alguns ensaios clínicos como o objetivo principal de demonstrar os efeitos benéficos da terapêutica em doentes crônicos. Apesar da obtenção de resultados promissores em vários parâmetros, a taxa de recidiva é elevada após a interrupção do tratamento (Farci *et al.*, 2004; Niro *et al.*, 2005). Um ensaio clínico realizado no início dos anos 90 demonstrou que 50% dos doentes tratados durante 48 semanas com 9 milhões de unidades (MIU) de INF- $\alpha$  apresentavam a normalização dos valores bioquímicos, virológicos e achados histológicos. Contudo, após o tratamento, apenas



21% apresentavam marcadores satisfatórios (Farci *et al.*, 1994). Os estudos posteriores, com as doses elevadas de INF, demonstraram também apenas resultados benéficos transitórios (Madejón *et al.*, 1998). É ainda de realçar que, para além das suas propriedades antivirais, o INF- $\alpha$  possui capacidades imunomoduladoras e anti-proliferativas. Todavia, os efeitos imunomoduladores podem não apenas agravar as doenças autoimunes pré-existentes, como induzir as doenças autoimunes de novo em pacientes tratados (Cha *et al.*, 2014; Aslam *et al.*, 2015).

Atualmente, a terapêutica mais popular consiste em INF- $\alpha$  modificado por polietilenoglicol (PEG), que é a única terapia que mostrou alguma atividade antiviral específica contra o HDV. A sua eficácia é ainda assim diminuta (Kabaçam *et al.*, 2012). Uma redução do título viral é apenas observada em 15% - 40% dos doentes e a necessidade de administrações prolongadas resulta frequentemente em efeitos adversos frequentes e severos, quais incluem fadiga, perda de peso e distúrbios psiquiátricos (Heller *et al.*, 2014; Goyal & Murray, 2015). O recurso a antivirais como a lamivudina, famciclovir e adefovir, usados em regime de monoterapia ou em combinação com o INF- $\alpha$ , não demonstraram utilidade dado que o título viral de HDV permaneceu inalterado. Estes antivirais, conhecidos inibidores de replicação do HBV, não evidenciaram capacidade de intervir no ciclo replicativo do HDV (Lau *et al.*, 1999; Yurdaydin *et al.*, 2008).

A busca por novas terapias, alvos moleculares, drogas específicas e novas estratégias de tratamento, conferem ao HDV uma especial atenção por parte da comunidade científica. Sendo, atualmente, encarado como um importante desafio em saúde pública. A sua desconcertante simplicidade, com um pequeno genoma de RNA e com uma única proteína viral, o antígeno delta, tornam o HDV um excelente modelo experimental de estudo para os aspetos fundamentais da interação hospedeiro-agente patogénico e da biologia de RNA. Até à data, não foram identificadas quaisquer atividades enzimáticas associadas aos dois tipos de antígenos delta produzidos, dificultando o desenvolvimento de terapias eficazes. Tendo em conta que as interações dos antígenos de superfície do HDV com os antígenos de superfície do HBV são essenciais para a formação de novas partículas HDV capazes de propagarem infeção, interferir com estas interações do ponto de vista farmacológico surge como uma estratégia promissora para desenvolvimento de novas terapêuticas (Einav & Glenn, 2003). Alterações pós-

traducionais de proteínas são importantes para o ciclo de vida do HDV. O exemplo mais paradigmático destas modificações é a prenilação de um resíduo de cisteína presente na extremidade carboxílica da forma grande do antígeno de hepatite delta, determinante para a montagem das partículas virais do HDV (Hwang & Lai, 1993). Esta modificação, que envolve a transferência de um grupo farnesil para a cisteína na posição 211 do antígeno grande, é catalisada pelas farnesil-transferases celulares e torna o L-HDAg mais lipofílico, facilitando a sua interação com HBsAgs para a formação do envelope viral (Shen *et al.*, 2015). O desenvolvimento de inibidores de prenilação é, por isso, encarado como uma estratégia adequada e promissora no sentido de gerar novas opções farmacológicas capazes de intervirem num aspeto fundamental do ciclo de vida do HDV, interferindo com a sua replicação e reduzindo a propagação da infeção (Otto & Casey, 1996). Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma redução acentuada e significativa da produção de partículas virais de HDV na presença de inibidores de prenilação como o FTI-277, FTI-2153 e BZA-5B (Bordier *et al.*, 2002; 2003). Estes inibidores, que parecem ser específicos de HDV pois interferem na prenilação do L-HDAg mas não de outras proteínas celulares que são igualmente alvo desta modificação pós-traducional, apresentam como senão a sua marcada toxicidade em ensaios de viabilidade celular (Bordier *et al.*, 2002). Já outros inibidores, como o ABT-100, apresentam uma menor toxicidade celular. Apesar da demonstração do potencial do ABT-100 como supressor do desenvolvimento de tumores hepáticos, este parece ser menos específico e uma eventual interferência com a biologia do HDV carece ainda de investigação mais detalhada (Carloni *et al.*, 2005).

### 1.1.5 Considerações finais

O vírus da hepatite delta é o agente etiológico responsável pela forma mais grave da doença hepática viral (Rizzetto *et al.*, 1997). Após a descoberta do HDV, a sua análise detalhada tem revelado várias características incomuns entre os agentes patogénicos conhecidos (Rizzetto, 2009). Atualmente não existem tratamentos específicos com capacidade de eliminar a infeção pelo HDV. O tratamento da hepatite delta com a

terapêutica disponível revela apenas uma diminuição da replicação viral durante o decorrer do tratamento. Contudo, após a interrupção do tratamento, é detetável um novo aumento da carga viral, e ainda, a exacerbação da doença hepática crônica, caracterizada por falência da função hepática (Niro *et al.*, 2005; Rizzetto, 2009). Tendo em conta a inexistência de uma terapia disponível com elevada eficácia, é essencial o desenvolvimento de novas terapêuticas mais eficazes e seguras. A necessidade de encontrar novas opções terapêuticas levou ao desenvolvimento de fármacos dirigidos a moléculas específicas e cascatas de sinalização relevantes no ciclo do vírus delta. Algumas das propriedades do HDV têm vindo a assumir particular importância de virem a ser potenciais alvos terapêuticos (Durantel & Zoulim, 2016). Este é o caso do mecanismo de prenilação do L-HDAg, que permite a interação com os antígenos de superfície de HBV, fundamental para a montagem das partículas virais do HDV. Este processo indispensável é catalisado por enzimas celulares do grupo das farnesil-transferases. Desta forma, inibidores de farnesil-transferases (FTIs) poderão constituir uma abordagem terapêutica promissora contra a infeção provocada por HDV (Bordier *et al.*, 2003).

Um dos eventos intracelulares relevantes no desenvolvimento do CHC é a sobreexpressão dos fatores STAT3 e nuclear kappa B, dois fatores de transcrição que regulam vários genes específicos envolvidos na transformação oncogénica. Dado o papel do L-HDAg na ativação de STAT3 e NF-kB e envolvimento da prenilação neste processo, os FTIs poderão traçar um esquema terapêutico promissor no controlo da infeção por HDV e na progressão para estádios mais avançados de carcinoma hepatocelular induzidos pela infeção viral (Williams *et al.*, 2012).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho tem com objetivo principal verificar a eficácia dos inibidores de prenilação como possível abordagem terapêutica para o HDV.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

1. Desenvolver novos fármacos derivados dos inibidores de farnesil-transferase comercialmente disponíveis;
2. Analisar a citotoxicidade induzida por novos compostos nas células da linha celular Huh7D12;
3. Correlacionar a capacidade dos fármacos de intervir nos níveis de expressão do genoma viral do HDV;
4. Analisar a ação dos fármacos sobre a expressão dos oncogenes associados ao desenvolvimento e progressão do carcinoma hepatocelular.

## **2. Materiais e métodos**

## 2.1 Linhas celulares

Neste trabalho utilizou-se a linha celular Huh7D12, que resulta da transfeção estável da linha celular Huh7, derivada de um hepatoma humano, com o plasmídeo pSVL (D3). O plasmídeo pSVL (D3) contém um trímico do cDNA completo do HDV, originalmente obtido por transcrição reversa do RNA total do fígado de uma marmota infectada com HDV, e clonado no vetor de expressão eucariota pSVL (Kuo *et al.*, 1988). Deste modo, a linha celular usada possui várias cópias de cDNA do HDV integrados no seu genoma, expressando constitutivamente ambos os antígenos delta e todas as moléculas de RNA associadas ao ciclo de vida do HDV.

A linha celular Huh7D12 foi descongelada e propagada em monocamada (células aderentes) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha), com L-glutamina e  $\text{NaHCO}_3$ , enriquecido com soro bovino fetal (FBS; *Fetal Bovine Serum*; GIBCO, Alemanha) com concentração final de 10% (v/v) e suplementado com 200  $\mu\text{g/ml}$  de Geneticina (G418; Sigma-Aldrich, Alemanha). As células foram cultivadas em frascos estéreis com 75  $\text{cm}^2$  de área (Sarstedt, Alemanha) e mantidas em cultura no meio apropriado a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . O controlo de uma eventual contaminação foi regularmente efetuado.

Quando foi observada uma confluência de células superior a 90%, estas foram removidas do frasco de cultura e passadas para um novo frasco a uma densidade inferior, processo este que se repetiu a cada três ou quatro dias. Este processo de manutenção celular incluiu remoção do meio de cultura, lavagem com solução salina tamponada de fosfatos (PBS 1x) e incubação com 0,5 ml de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma-Aldrich, Alemanha) por um período de 2-3 minutos a 37°C por forma a ocorrer separação celular. Seguidamente, a tripsina foi inativada pela adição de 9,5 ml de meio de cultura, as células foram ressuspensas neste novo meio e transferidas para um novo frasco de cultura.

## 2.2 Fármacos

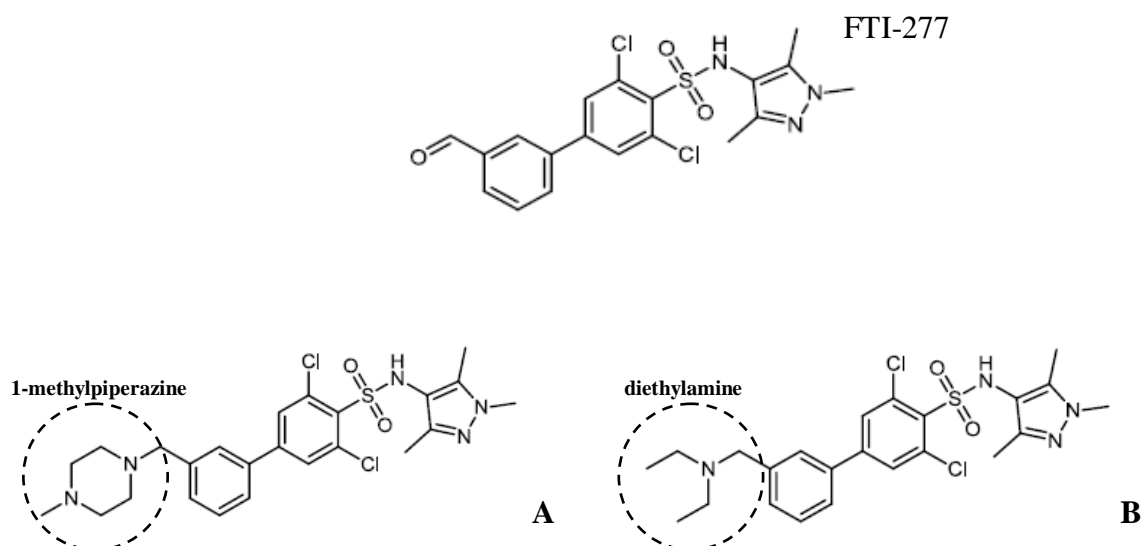
No decorrer deste estudo foram utilizados os fármacos FTI-277 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e Myricitrin (Sigma-Aldrich, Alemanha), adquiridos comercialmente, bem como os compostos sintetizados A e B derivados do inibidor FTI-277.

Na preparação da solução de uso na concentração de 5 mM de FTI-277, 1 mg de fármaco foi dissolvido em 400 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução foi homogeneizada e guardada a -20°C, por um período máximo de validade de 1 mês, de acordo com as recomendações do fabricante.

Na preparação da solução de uso na concentração de 10 mM de Myricitrin, 1 mg de fármaco foi dissolvido em 215 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução foi homogeneizada e guardada a -20°C, por um período máximo de validade de 1 mês, de acordo com as recomendações do fabricante.

Os compostos derivados do FTI-277 foram sintetizados no Departamento de Química do Instituto Politécnico de Lisboa, pelo grupo de investigação da Professora Paula Robalo. De todos os compostos derivados do FTI-277, apenas dois foram utilizados neste estudo. Denominados daqui em diante como compostos A e B. Estes compostos diferem entre eles, unicamente num grupo radical, ou seja, enquanto que o composto A apresenta um grupo 1-methylpiperazine, o composto B apresenta um grupo diethylamine (figura 2.1).

Na preparação da solução de uso na concentração de 1 mM de ambos os compostos A e B, foram pesados 2,5 mg de cada composto e diluídos em 300 µl de DMSO. A solução foi homogeneizada e guardada a -20°C.



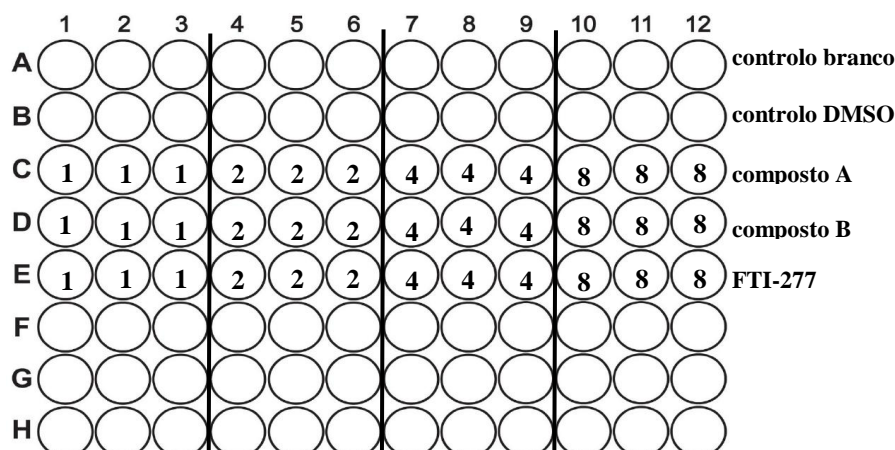
**Figura 2.1:** Representação das estruturas químicas do fármaco FTI-277, do composto A e do composto B. O grupo divergente entre os dois compostos encontra-se assinalado.

### 2.3 Ensaio da viabilidade celular

Os estudos de viabilidade celular descritos neste trabalho foram efetuados em placas *multiwell* de 96 poços, contendo cada poço 100 µl de suspensão celular. A viabilidade celular foi testada utilizando o *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit* (Promega, Alemanha). Para o efeito, as células (cerca de  $1 \times 10^4$  células/poço) foram mantidas na ausência (controlo) e presença dos fármacos FTI-277, composto A e composto B, em concentrações entre os 1 µM e 8 µM. Em todos os ensaios efetuados, foram usados dois tipos de controlo: 1) presença de meio da cultura na ausência de células num volume de 100 µl/poço – controlo branco; 2) suspensão celular incubada com o solvente DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) – controlo DMSO. Após adição dos fármacos nas suas concentrações específicas, as placas de *multiwell* foram incubadas por um período de 48h a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (figura 2.2). Todos os ensaios de viabilidade descritos foram realizados em triplicado para cada uma das concentrações analisadas. Findo o período de incubação, 20 µl do reagente foram adicionados a cada poço. Após ressuspensão, as placas de *multiwell* foram novamente



incubadas durante 4h a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as amostras foram lidas num espectrofluorímetro Triad (Dynex Technologies, EUA), analisando-se a absorvância nos comprimentos de onda de 560 nm (espectro de emissão) a 590 nm (espectro de excitação).



**Figura 2.2: Esquema da placa multiwell de 96 poços.** Linha A corresponde ao controle em branco (apenas contém o meio RPMI). Linha B corresponde ao controle DMSO (células expostas ao DMSO). Linha C corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto A. Linha D corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto B. Linha E corresponde a células Huh7D12 incubadas com FTI-277. Colunas 1-3 correspondem a concentração de 1 µM de cada fármaco. Colunas 4-6 correspondem a concentração de 2 µM de cada fármaco. Colunas 7-9 correspondem a concentração de 4 µM de cada fármaco. Colunas 10-12 correspondem a concentração de 8 µM de cada fármaco.

## 2.4 Análise dos mecanismos de ação dos fármacos em teste: FTI-277, compostos A e B, e Myricitrin

Para analisar os efeitos de FTI-277, Myricitrin, composto A e composto B sobre a expressão dos vários genes de interesse, células Huh7D12 foram colocadas em placas de cultura 35×10 mm (VWR, Pensilvânia). Por cada placa foram distribuídos 0,4 ml da suspensão celular (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por placa) e 1,1 ml de meio de cultura RPMI. As células foram mantidas em cultura a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24h antes da adição dos fármacos. Findo este período, as células Huh7D12 foram incubadas durante 48h com cada

fármaco em estudo. Em simultâneo, efetuaram-se também controlos de DMSO. As concentrações dos fármacos utilizadas estão descritas na tabela 2.1.

Fármaco	Concentração (µM)	Controlo – DMSO (µl)
FTI-277	1	1,5
Myricitrin	100	
Composto A	1	
	2	
Composto B	1	
	2	

**Tabela 2.1:** As concentrações dos fármacos e o volume de DMSO usados.

### 2.4.1 Extração e quantificação de RNA

O RNA total foi extraído e purificado usando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O meio de cultura das amostras foi removido e as células foram lavadas com 1 ml de PBS 1x. Após a remoção da solução de lavagem, as células foram lisadas pela adição de 350 µl da solução Buffer RLT suplementada com β-Mercaptoetanol. O conteúdo foi em seguida transferido para uma coluna QIAshredder (Qiagen, Alemanha) sendo de seguida centrifugada durante 2 minutos a 13000 rpm (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). Após centrifugação, 350 µl de etanol 70% foram adicionados à amostra, a mistura foi homogeneizada e transferida para uma coluna RNeasy mini. Após centrifugação durante 20 segundos a 10000 rpm (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), foram adicionados 700 µl de Buffer RW1, sendo a amostra posteriormente submetida a uma nova centrifugação durante 20 segundos a 10000 rpm (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). De seguida, a coluna foi lavada duas vezes com 500 µl de Buffer RPE e, por último, foram adicionados à coluna 40 µl de água livre de RNases seguida de uma última centrifugação durante 1 minuto a 10000 rpm (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha).

Os RNAs purificados foram quantificados através do espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo scientific, EUA). O grau de pureza foi avaliado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 nm e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram armazenadas a -20°C.

### **2.4.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA. A reação de transcrição reversa (RT)**

A síntese de cDNA foi executada a partir do RNA extraído usando o *kit* comercial *NZY First-strand cDNA Synthesis* (NZYTech, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

A preparação foi efetuada em gelo. Os reagentes para a mistura de reação foram adicionados ao tubo de microcentrifugação, tendo sido utilizado o volume final de reação de 20 µl. Inicialmente foi adicionado a cada tubo um volume correspondente a 1 µg de RNA e água livre de nucleases, num volume final de 8 µl. De seguida, em cada amostra colocaram-se 10 µl NZYRT 2x Master Mix e 2 µl NZYRT Enzyme Mix. Seguidamente à homogeneização das misturas de reação, as amostras foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e seguidamente colocadas num termociclador MJ Mini (BioRad, EUA). A reação de RT decorreu de acordo com seguinte programa: 30 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. Num passo seguinte, adicionou-se 1 µl NZY RNase H e as amostras foram deixadas no termociclador por mais 20 minutos a 37°C. No fim deste passo, o produto final (cDNA) foi armazenado a -20°C para a sua posterior utilização.

### **2.4.3 Reação em cadeia de polimerase – PCR**

As reações de PCR foram efetuadas utilizando a *Red Taq Master Polymerase Master Mix* (VWR, Pensilvânia), que contém 0,2 U/µl de *Taq Polymerase*, MgCl<sub>2</sub> numa concentração final de 1,5 mM e dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). A técnica de PCR foi realizada em reações com um volume final de 25 µl. Cada reação continha 12,5

μl de *Taq 2x Master Mix*, 9,5 μl de água livre de nucleases, 0,5 μl de cada *primer* (*forward e reverse*) a 10μM e 2 μl do produto de cDNA obtido na reação de transcrição reversa.

Em todas as reações foi incluído um controlo negativo no qual em vez de cDNA adicionaram-se 2 μl de água livre de nucleases, de modo a detetar uma possível contaminação não desejada.

Os *primers* usados são descritos na tabela 2.2, tendo sido por nós desenhados utilizando o *software* Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e sendo estes complementares das sequências que flanqueiam os fragmentos a amplificar. As reações de PCR foram efetuadas num termociclador GenePro (Bioer, China) nas condições de temperatura e tempo descritos na tabela 2.3. A amostra foi guardada a -20°C até utilização posterior.

A avaliação dos resultados de PCR foi efetuada recorrendo à técnica de eletroforese em gel de agarose.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Tamanho (pb)
HDV expressão	GGACCCCTTCAGCGAACA	CCTAGCATCTCCTATCGCTAT	42
STAT3 (exão 3-4)	TCCTGGGAGAGATTGACCAG	GTGGCTGCATGTAGAAGG	41
NF-kB2 (exão 2-7)	AAAATTCTGGGAAGCAGAACC	GCAGGACACCCAGGTTGTTA	41
CDK2 (exão 1-6)	ACAAGTTGACGGGAGAGGTG	AAAGATGAAGAGCTGGT	40
PIM1 (exão 2-5)	CTCGGTCTACTCAGGCATCC	CCCCTGATGATCTCTTCGTC	40
BMP5 (exão 2-7)	TCATGGAGAGGCAGTGACAG	AGGCTTTGGTACGTGGTCAG	40

**Tabela 2.2:** Lista dos primers utilizados no ensaio de PCR.

Etapas do PCR	Número de ciclos	Duração dos ciclos (segundos)	Temperatura (°C)
Desnaturação inicial	1	300	95
Desnaturação	30	60	95
Hibridação		60	56
Extensão		60	72
Extensão final	1	300	72
Armazenamento	1	Tempo indeterminado	4

**Tabela 2.3:** Ciclos de temperatura e respetiva duração usados nas reações de PCR.

#### **2.4.4 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos resultantes das reações de PCR foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose (2%), em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE), a 80 volts durante aproximadamente 1 hora e 15 minutos. Para formar o gel dissolveram-se 2 gramas de agarose em 100 ml de TAE 1x, usando um forno de micro-ondas. Após arrefecimento, adicionaram-se 5 µl de corante *GelRed* (Biotium, EUA). Esta solução foi deixada a solidificar dentro de um molde com um número de poços adequado. Para realização da eletroforese foram redistribuídos por cada poço 12,5 µl dos produtos de PCR.

Para determinar o peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR, utilizámos 3 µl do marcador *Low Range DNA Ladder* (Thermo scientific, EUA).

Os resultados dos ensaios foram verificados visualmente usando um transiluminador de luz UV (BioRad, China) e as imagens captadas digitalmente.

### **3.Resultados**

### 3.1 Síntese de compostos derivados de FTI-277 e análise dos efeitos em termos de viabilidade celular

A prenilação de um resíduo de cisteína presente na extremidade carboxílica da forma grande do antígeno de hepatite delta é determinante no processo de montagem das partículas virais do HDV. Através desta modificação pós-traducional, que envolve a transferência de um grupo farnesil para a cisteína na posição 211 do L-HDAg, o antígeno grande do HDV torna-se mais lipofílico, o que facilita a sua interação com os antígenos de superfície do HBV (Shen *et al.*, 2015).

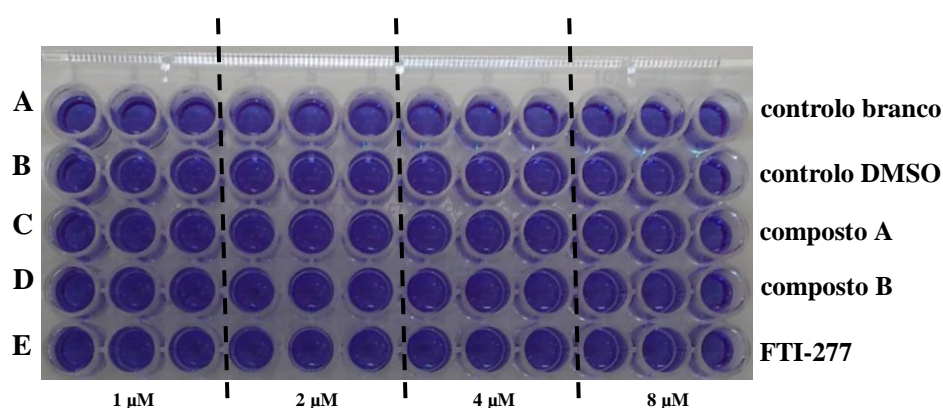
O desenvolvimento de inibidores de prenilação é uma estratégia promissora no sentido de gerar novas opções farmacológicas capazes de intervir neste aspeto fundamental do ciclo de vida do HDV. Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma redução acentuada e significativa da produção de partículas virais de HDV na presença de inibidores de prenilação como o FTI-277 (Bordier *et al.*, 2002; 2003). Este inibidor, que parece ser específico de HDV pois interfere na prenilação do L-HDAg mas não de outras proteínas celulares, apresenta como senão a sua marcada toxicidade em ensaios de viabilidade celular (Bordier *et al.*, 2002; 2003).

A origem deste trabalho começou pela síntese de variantes químicas do inibidor FTI-277, que foi adquirido comercialmente. Apesar de vários compostos terem sido obtidos no decorrer deste processo, o nosso trabalho concentrou-se na análise do potencial farmacológico de dois derivados do FTI-277, os compostos A e B. Tendo em conta a descrita citotoxicidade associada ao FTI-277, decidimos analisar os efeitos dos compostos A e B em termos de viabilidade celular.

Células humanas Huh7D12, que expressam constitutivamente ambos os antígenos delta e todas as moléculas de RNA associadas ao ciclo de vida do HDV, foram colocadas a crescer em placas de 96 poços e incubadas durante 48h com quantidades crescentes dos três inibidores referidos no parágrafo anterior. Após incubação, a viabilidade celular foi analisada utilizando o *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit*. O estudo da viabilidade celular baseia-se num processo metabólico, que compreende a adição de um indicador redox fluorogénico (resazurina) à cultura celular. A resazurina, um composto azul não fluorescente, irá atuar como aceitador intermediário de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial. Esta reação irá ser acompanhada pela alteração da cor, com passagem de

azul não fluorescente (forma oxidada) para rosa fluorescente (resorufina). Esta mudança de cor pode ser medida recorrendo à espectrofluorimetria e posteriormente estimada a viabilidade celular.

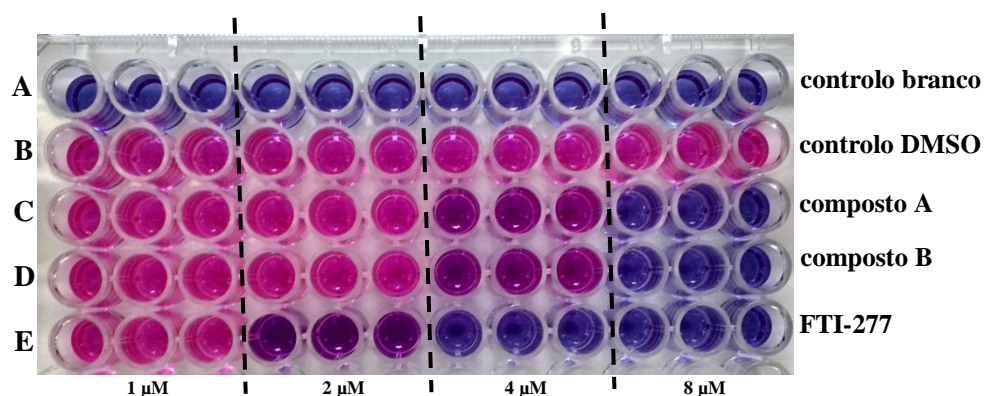
A figura 3.1 demonstra a placa *multiwell* de 96 poços com amostras redistribuídas no momento imediato após a adição do indicador fluorogénico (resazurina). Observa-se a coloração azul não fluorescente em todos os poços (da linha A à linha E), indicativo da presença da resazurina, que irá ser incorporada pelas células.



**Figura 3.1: Representação da placa de 96 poços, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular.** Linha A corresponde ao meio da cultura RPMI-1640 num volume de 100μl. Linha B corresponde a células Huh7D12 incubadas com DMSO. Linha C corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto A. Linha D corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto B. Linha E corresponde a células Huh7D12 incubadas com FTI-277. Após incubação com fármacos durante 48h, por cada poço foram adicionados 20μl do reagente disponível no *kit*. Todos os fármacos foram incubados numa concentração de 1 μM, 2 μM, 4 μM e 8 μM. O ensaio foi realizado em triplicado para cada concentração.

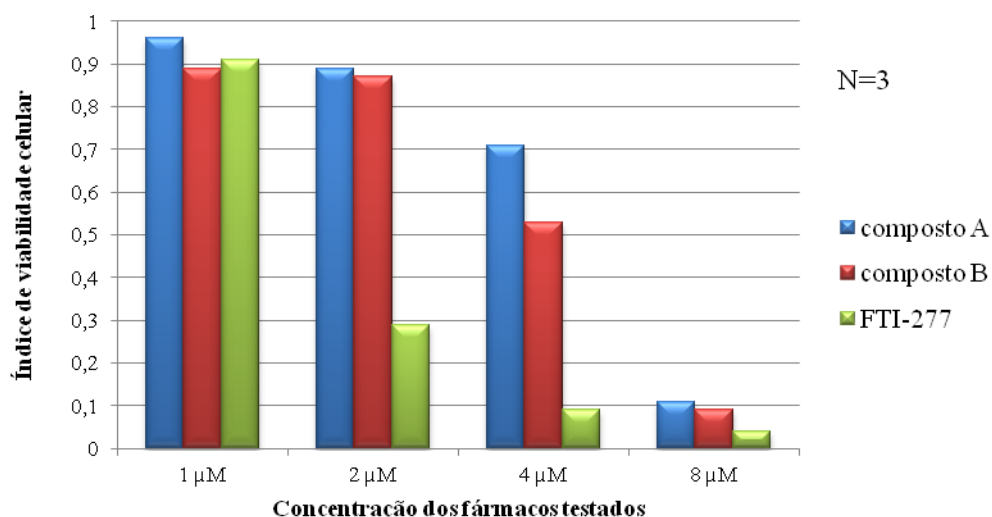
Após incubação com resazurina durante 4h, foi observada a mudança da cor dos compostos, indicativo da ocorrência da reação redox. A figura 3.2 representa a placa *multiwell* ao fim das 4h de incubação a 37°C.





**Figura 3.2: Representação da placa de 96 poços após incubação durante 4h com resazurina, realizada no contexto de ensaio da viabilidade celular.** Linha A corresponde ao meio da cultura RPMI-1640 num volume de 100  $\mu$ l. Linha B corresponde a células Huh7D12 incubadas com DMSO. Linha C corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto A. Linha D corresponde a células Huh7D12 incubadas com composto B. Linha E corresponde a células Huh7D12 incubadas com FTI-277. Todos os fármacos foram incubados numa concentração de 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 8  $\mu$ M. O ensaio foi realizado em triplicado para cada concentração

Após incubação, as placas foram lidas num espectrofluorímetro analisando-se a absorvância nos comprimentos de onda de 560 nm (espectro de emissão) a 590 nm (espectro de excitação). Um total de três ensaios independentes foi efetuado, analisando os efeitos dos fármacos em termos de viabilidade celular em concentrações farmacológicas crescentes, entre 1  $\mu$ M e 8  $\mu$ M. Após quantificação, os resultados foram normalizados em relação ao controle DMSO (figura 3.3).



**Figura 3.3:** Gráfico ilustrativo dos valores médios do índice de viabilidade celular das células Huh7D12. Análise dos efeitos dos compostos A e B, e do FTI-277 em termos de viabilidade celular em concentrações farmacológicas crescentes, entre 1  $\mu$ M e 8  $\mu$ M. Os resultados apresentados correspondem à uma média de três ensaios independentes.

Tal como se pode observar na figura 3.3, na concentração de 1  $\mu$ M nenhum dos três inibidores de farnesil-transferases celulares interfere com a viabilidade das células Huh7D12. Em oposição, nas concentrações de 2  $\mu$ M e 4  $\mu$ M, o efeito tóxico do FTI-277 é mais evidente em comparação com os compostos A e B. Por último, na concentração de 8  $\mu$ M, os três inibidores testados mostram um efeito marcado na viabilidade celular das células Huh7D12. Comprovamos assim que os compostos A e B, derivados do FTI-277, são menos tóxicos para as células que o inibidor comercial de origem (FTI-277), quando utilizado nas mesmas concentrações.

### 3.2 Efeito dos inibidores de farnesil-transferases na expressão do RNA genómico do HDV

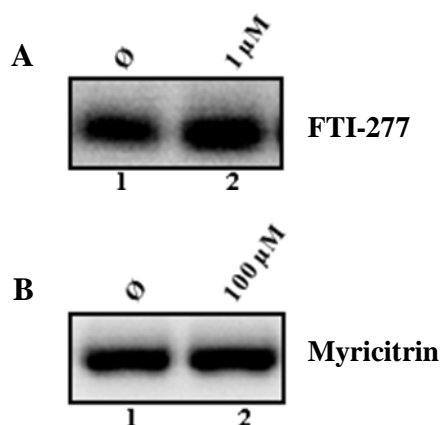
Para avaliar o potencial dos fármacos em teste a intervir no ciclo biológico do vírus HDV, decidimos testar se estes inibidores influenciam a expressão do RNA genómico do HDV. Para este efeito, começámos por colocar células Huh7D12 em placas de cultura 35×10 mm e incubámos as células com 1  $\mu$ M de FTI-277 durante 48h. Por

forma a avaliar a especificidade de um eventual efeito, recorreremos à utilização de um outro inibidor, Myricitrin, um flavonoide extraído de algumas plantas, que é um conhecido inibidor da proteína cinase C (PKCi; *protein cinase C inhibitor*; Pereira *et al.*, 2011). Após incubação das células Huh7D12 com estes dois fármacos, extraímos o RNA total, sintetizamos o cDNA e avaliámos os níveis de expressão do RNA genómico do HDV através da reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos para o genoma do HDV, descrito previamente na literatura (Freitas *et al.*, 2012).

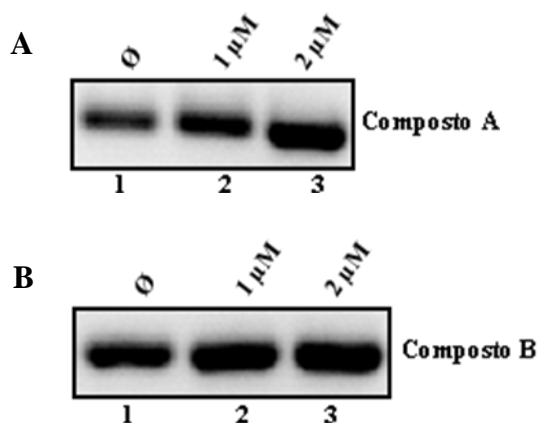
Os resultados mostram que, comparativamente ao controlo correspondente à ausência de fármaco, a incubação das células Huh7D12 com FTI-277 conduz a um aumento dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV (figura 3.4, painel A, linha 2). Em contraste, não se verificam alterações nos níveis de expressão quando o inibidor Myricitrin foi utilizado (figura 3.4, painel B).

Em seguida, decidimos analisar se os compostos A e B, derivados do FTI-277, manteriam a capacidade do inibidor original em modular a expressão do RNA genómico do HDV. Dado que os compostos A e B apresentaram uma menor citotoxicidade nos ensaios de viabilidade descritos no ponto 3.1, incubámos as células Huh7D12 durante 48h com duas concentrações destes inibidores (1 $\mu$ M e 2  $\mu$ M). Os resultados mostram um aumento dependente da dose dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV comparativamente ao controlo correspondente à ausência de fármaco (figura 3.5, painéis A e B).

Com os resultados descritos nas figuras 3.4 e 3.5, verificamos que os inibidores de farnesil-transferases utilizados neste estudo têm a capacidade de interferir na expressão do RNA genómico do HDV nas células Huh7D12, um efeito que aparenta ser específico, dado que o mesmo não se verifica quando inibidores de outro tipo de enzimas celulares foram utilizados.



**Figura 3.4: Influência de FTI-277 (painel A) e Myricitrin (painel B) nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV.** Níveis de RNA genômico do HDV foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controles DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM) e Myricitrin (100µM).



**Figura 3.5: Influência dos compostos A (painel A) e B (painel B) nos níveis de expressão do RNA genômico do HDV.** Níveis de RNA genômico do HDV foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controles DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos compostos A e B na concentração de 1 µM. Linhas 3 correspondem aos compostos A e B na concentração de 2 µM.

### **3.3 Efeito dos inibidores de farnesil-transferases na expressão de oncogenes**

#### **3.3.1 Influência de FTI-277 e dos compostos A e B nos níveis de expressão STAT3 e NF-kB**

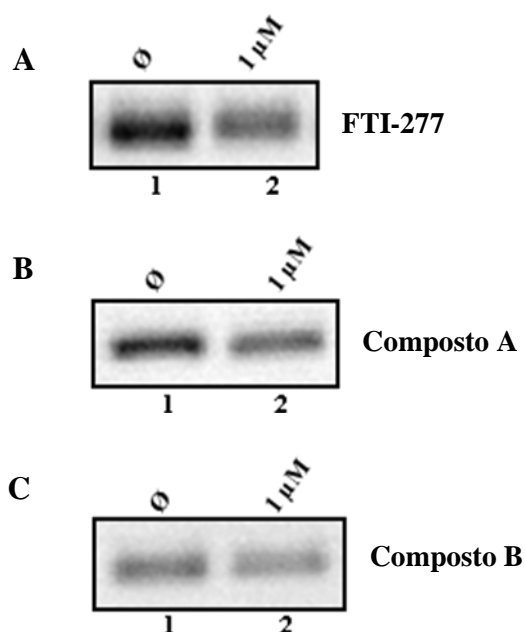
Vários estudos revelaram que a infecção por HDV é responsável pelo desenvolvimento de cirrose hepática e pela progressão precoce para estádios mais avançados de carcinoma hepatocelular, contudo face à complexidade dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento deste tumor, estes mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Um conjunto de estudos *in vitro* demonstraram que o L-HDAg apresenta capacidade de ativar vários promotores heterólogos e elementos ativadores. Alguns destes estudos mostraram um papel do L-HDAg na ativação de NF-kB e de STAT3, dois fatores de transcrição que por sua vez regulam vários genes específicos envolvidos na transformação oncogénica (Park *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012). Estas observações parecem apoiar a ideia que os componentes do HDV, e em particular o L-HDAg, são capazes de interferir em várias funções celulares da célula hospedeira.

Tendo em conta que as modificações pós-traducionais são eventos importantes no correto funcionamento das proteínas, decidimos analisar se a prenilação do L-HDAg seria importante na regulação da expressão destes dois fatores de transcrição. Inicialmente testámos se os três inibidores de farnesil-transferases em estudo influenciam a expressão do STAT3. Para tal, as células Huh7D12 foram colocadas em placas de cultura e incubadas com fármacos na concentração de 1  $\mu$ M durante 48h. Findo este período, extraímos o RNA total, sintetizamos cDNA e avaliamos os níveis de expressão do transcrito de STAT3 através da técnica de PCR utilizando um par de *primers* específicos para a região constitutiva do STAT3 compreendida entre os exões 3 e 4. Os resultados mostram que, comparativamente ao controlo DMSO, a incubação das células Huh7D12 com os fármacos em teste durante 48h conduz a uma diminuição nos níveis de expressão do transcrito de STAT3 (figura 3.6, painéis A, B e C).

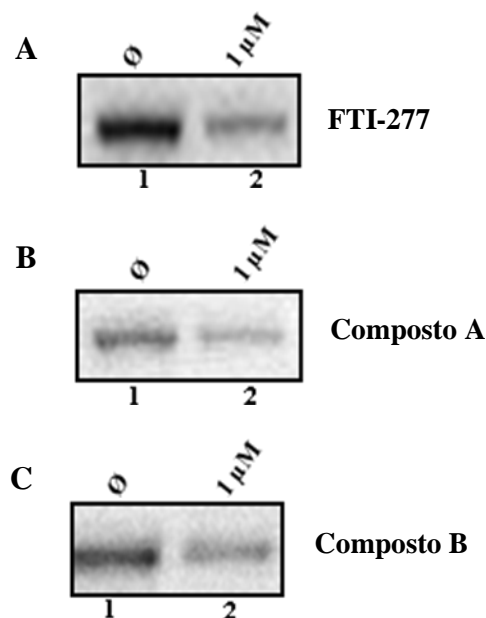
De seguida, decidimos analisar se os fármacos em teste tinham a capacidade de modular a expressão de NF-kB. Para este efeito, realizamos o mesmo procedimento descrito no

parágrafo anterior, utilizando um par de *primers* específicos para a região constitutiva do NF-kB compreendida entre os exões 2 e 7. Os resultados apresentados na figura 3.7 mostram que, comparativamente ao controlo correspondente à ausência de fármaco, a incubação das células Huh7D12 com FTI-277 e os compostos A e B durante 48h conduz a uma redução dos níveis de expressão do transcrito do NF-kB (figura 3.7, painéis A, B e C).

Com os resultados descritos nas figuras 3.6 e 3.7, constatamos que tanto o fármaco comercial FTI-277 como os compostos A e B têm potencial de interferir na expressão destes dois oncogenes.



**Figura 3.6: Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito de STAT3.** Níveis do transcrito de STAT3 foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controlos DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM), composto A (1µM) e composto B (1µM).



**Figura 3.7: Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito de NF-κB.** Níveis do transcrito de NF-κB foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controles DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM), composto A (1µM) e composto B (1µM).

### 3.3.2 Influência de FTI-277 e dos compostos A e B nos níveis de expressão PIM1, BMP5 e CDK2

Vários vírus têm demonstrado potencial em induzir transformações celulares malignas. A capacidade de influenciar a atividade de oncogenes e dos genes supressores de tumores, garantem as condições necessários para o surgimento e progressão do carcinoma hepatocelular. Vários autores demonstraram que a ativação do gene STAT3, o evento mais paradigmático na regulação de um oncogene por parte do HDV, potencia o desenvolvimento de uma vasta gama de doenças oncogénicas, como é o caso do CHC. (Benekli *et al.*, 2003; Levy & Inghirami, 2006). A intervenção na atividade do STAT3 promove a apoptose celular e interfere na proliferação de várias linhas celulares de hepatoma *in vitro* e *in vivo* (Lin *et al.*, 2011). Os estudos de amostras de tecido CHC humano demonstraram uma sobreexpressão desta proteína. Um estudo recente mostrou que a expressão transitória do L-HDAg do HDV em linhas celulares de hepatoma

humano conduz a um aumento da expressão do oncogene STAT3 através de um mecanismo que inclui a produção de espécies reativas de oxigénio, sugerindo que a ativação do STAT3 induzida pelo HDV possa ser o principal mecanismo através do qual o HDV conduz ao desenvolvimento de doença hepática e carcinoma hepatocelular (Williams *et al.*, 2012). Como foi demonstrado nos resultados do capítulo anterior, os inibidores de farnesil-transferases testados levaram a uma diminuição dos níveis de expressão do transcrito de STAT3. Tendo em conta que o CHC é um tumor complexo, com um conjunto de alterações na expressão de vários oncogenes e supressores tumorais, decidimos analisar se os inibidores em estudo tinham a capacidade de influenciar a expressão de outros genes cujo papel na carcinogénese hepática se encontrasse bem demonstrado. Após uma análise detalhada da literatura, concentrámos a nossa atenção em três genes, PIM1, CDK2 e BMP5. Para além de serem genes cuja desregulação está associada ao desenvolvimento de CHC (Svinka *et al.*, 2014; Ghouri *et al.*, 2017), um estudo recente que recorreu a ensaios de *microarrays* mostrou que os níveis de expressão destes genes são influenciados pela expressão transitória do HDV em células de hepatoma humano Huh7 (Benegiamo *et al.*, 2013).

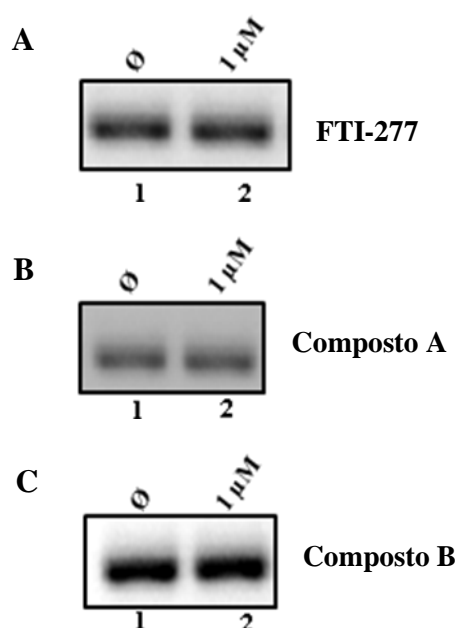
Para avaliar o potencial dos inibidores de farnesil-transferases em interferir na atividade destes oncogenes, inicialmente, decidimos testar se os inibidores do estudo, modulavam ou não, a expressão do transcrito de PIM1. Para este efeito, avaliámos os níveis de expressão do transcrito de PIM1 através da reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos para a região constitutiva do PIM1 compreendida entre os exões 2 e 5. Os resultados mostram ausência de variação nos níveis de expressão do transcrito de PIM1 na presença dos inibidores na concentração de 1  $\mu$ M, comparativamente ao controlo correspondente à ausência de fármacos (figura 3.8, painéis A, B e C). Com os resultados obtidos, denotamos que os inibidores de farnesil-transferases utilizados neste estudo não têm capacidade de interferir na expressão de PIM1.

De seguida, procedeu-se à avaliação dos níveis de expressão do transcrito de BMP5 na presença dos fármacos na concentração de 1  $\mu$ M através da reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos para a região constitutiva do BMP5 compreendida entre os exões 2 e 7. Os resultados mostram que a incubação das células Huh7D12 com os compostos A e B, conduz a uma redução dos níveis de expressão do transcrito, quando comparado com o grupo controlo (ausência de farmaco), (figura 3.9, painéis B e C).

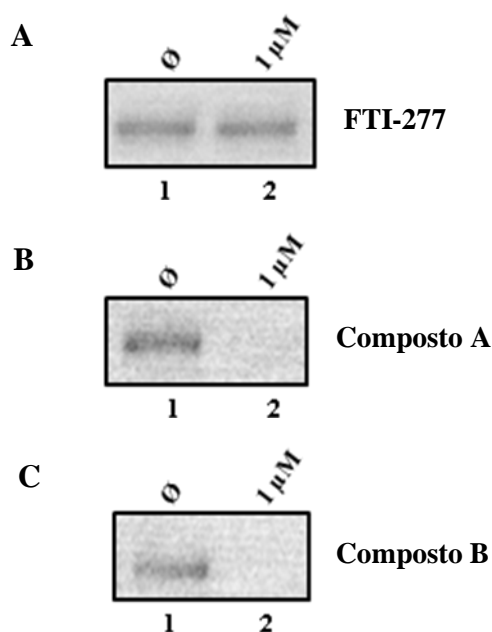


Por sua vez, na presença de FTI-277 durante 48h os resultados mostram ausência de variação nos níveis de expressão (figura 3.9, painel A).

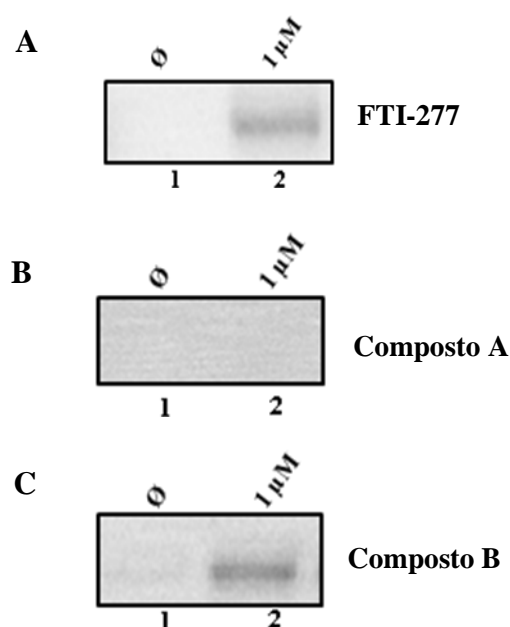
Por fim, avaliámos os níveis de expressão do transcrito de CDK2 através de PCR utilizando um par de *primers* específicos para a região constitutiva do CDK2 compreendida entre os exões 1 e 6. Os resultados mostram que, comparativamente ao controlo DMSO, a incubação das células Huh7D12 com FTI-277 e o composto B conduz a um aumento nos níveis de expressão do transcrito de CDK2 (figura 3.10, painéis A e C), enquanto que o composto A não apresenta qualquer influência na expressão do oncogene testado (figura 3.10, painel B).



**Figura 3.8: Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito PIM1.** Níveis do transcrito de PIM1 foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controlos DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM), composto A (1µM) e composto B (1µM).



**Figura 3.9: Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito BMP5.** Níveis do transcrito de BMP5 foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controles DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM), composto A (1µM) e composto B (1µM).



**Figura 3.10: Influência de FTI-277 (painel A) e dos compostos A (painel B) e B (painel C) nos níveis de expressão do transcrito CDK2.** Níveis do transcrito de CDK2 foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem aos controles DMSO (Ø). Linhas 2 correspondem aos fármacos FTI-277 (1µM), composto A (1µM) e composto B (1µM).

## **4. Discussão e conclusões**

O vírus da hepatite delta é o agente responsável pela forma mais severa e mortal de hepatite viral. Cerca de 40 anos após a sua descoberta, este pequeno vírus hepatotrópico continua a despoletar interesse na comunidade científica devido às suas particularidades estruturais e funcionais que o tornam ímpar entre os vírus animais. Apresenta semelhanças com os viróides das plantas no que respeita à formação de estruturas de RNA tipo bastonetes, assim como o seu reduzido tamanho e o modo de replicação (Taylor *et al.*, 1996; Rizzetto, 2009). Um dos outros aspetos interessantes é a dependência do HDV do vírus da hepatite B para o completar do seu ciclo biológico. A associação clínica entre estes dois vírus deve-se ao facto do invólucro externo do HDV ser constituído pelas proteínas de superfície do HBV que são necessárias para a propagação da infeção (Taylor, 2015). Dadas as características de vírus satélite do HBV, a infeção por HDV pode ser transmitida de duas formas, em simultâneo com o HBV ou em indivíduos previamente infetados pelo vírus da hepatite B (Hsieh *et al.*, 2006). A infeção crónica por ambos os vírus está associada a um aumento do risco de desenvolvimento de cirrose, carcinoma hepatocelular e hepatite fulminante (Gerin *et al.*, 2001).

O carcinoma hepatocelular é um dos tumores com maior incidência global e é uma das causas mais comuns de morte por cancro. É uma doença complexa onde múltiplas cascatas de sinalização estão alteradas, conduzindo a uma grande heterogenia biológica da doença (Alves *et al.*, 2011). Um conjunto de estudos *in vitro* demonstraram que o L-HDAg apresenta capacidade de ativar vários promotores heterólogos e elementos ativadores. Alguns destes estudos demonstraram a importância do L-HDAg na regulação do NF- $\kappa$ B e do STAT3, dois fatores de transcrição que regulam genes específicos envolvidos na patogénese hepática (Williams *et al.*, 2012; Chao *et al.*, 2017). Tendo em atenção o envolvimento da prenilação do L-HDAg neste processo, inibidores das enzimas celulares responsáveis por esta modificação pós-traducional poderão, terapêuticamente, vir a ter um papel de destaque no controlo da infeção por HDV e na progressão do carcinoma hepatocelular induzido pela infeção viral, para estádios mais avançados (Einav & Glenn, 2003).

Fase à inexistência de tratamentos específicos capazes de eliminar a infeção pelo HDV, a única estratégia terapêutica atualmente disponível e aprovada, é o interferão- $\alpha$ , contudo manifesta limitações (Abbas *et al.*, 2011). Após a interrupção do tratamento, é

detetável um novo aumento da carga viral, e ainda, a exacerbação da doença hepática crónica caracterizada por falência da função hepática. Recentemente foi desenvolvida uma nova fórmula de INF- $\alpha$  modificado por polietilenoglicol (PEG), que é a única terapia que mostrou alguma atividade antiviral específica contra o HDV (Yurdaydin, 2012). A sua eficácia é ainda assim diminuta e a necessidade de administrações prolongadas resulta muitas vezes em efeitos adversos frequentes e severos (Heller *et al.*, 2014). Para além do interferão, outros fármacos antivirais, como a lamivudina, famciclovir e adefovir, usados em regime de monoterapia ou em combinação com o INF- $\alpha$ , foram testados no tratamento da hepatite delta embora sem sucesso (Yurdaydin *et al.*, 2008, Triantos *et al.*, 2012). De um modo geral, verificou-se que os fármacos que inibem o HBV exercem pouco ou nenhum efeito sobre o HDV. Uma explicação provável para a ineficácia dos tratamentos com estes antivirais pode estar relacionada com o facto dos fármacos utilizados não afetarem a expressão dos HBsAgs (Farci *et al.*, 2006). Deste modo, é essencial desenvolver novas terapêuticas que, por um lado, sejam eficazes no tratamento e por outro, garantem a segurança dos doentes. A necessidade de encontrar novas opções terapêuticas levou ao desenvolvimento de fármacos dirigidos a moléculas específicas e cascatas de sinalização relevantes no ciclo do vírus da hepatite delta.

Apesar de ainda existir algum desconhecimento quanto ao mecanismo de interação entre o L-HDAg e os HBsAgs, as modificações pós-traducionais do L-HDAg neste processo assumem especial relevância, nomeadamente a prenilação da cisteína 211 (Shen *et al.*, 2015). Os quatro últimos aminoácidos da extremidade C-terminal do L-HDAg formam um sinal de prenilação, no qual o resíduo de cisteína é modificado pela adição covalente de um lípido prenil. Esta modificação é catalisada pelas farnesil-transferases celulares, tornando mais lipofílico o L-HDAg, facilitando desta forma a sua interação com os HBsAgs (Lee *et al.*, 1995; Otto & Casey, 1996). Estas enzimas celulares revelam-se assim importantes no estudo de novas abordagens terapêuticas, que poderão vir a ser utilizadas no futuro para o tratamento da hepatite delta crónica. Uma terapia antiviral baseada na inibição da prenilação difere das abordagens terapêuticas mais clássicas na medida em que o alvo do tratamento consiste numa enzima celular e não num componente do vírus (Einav & Glenn, 2003).

O S-HDAg também poderá ser alvo dos processos pós-traducionais tais como metilação, acetilação e fosforilação. A fosforilação dos resíduos das serinas 2 e 177 são as principais modificações do S-HDAg e são importantes para as suas funções na replicação do RNA viral. A inibição da atividade destas cinases diminui a fosforilação do S-HDAg e causa uma redução drástica na acumulação de RNA do HDV (Yeh *et al.*, 1996; Mu *et al.*, 2001). Neste contexto, o uso dos inibidores de fosforilação do S-HDAg poderá constituir uma opção terapêutica para o tratamento da hepatite delta.

A entrada desta partícula viral na célula hepática poderá também constituir objeto de interesse para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Estudos recentes de Yan e colaboradores (2012) demonstraram a importância do recetor NTCP celular da superfície hepática na interação de alta afinidade com os HBsAgs, através do silenciamento do gene que expressa este cotransportador, mostrando assim a inibição da infecção por HBV e HDV (Yan *et al.*, 2012).

Deste modo, os esforços devem-se direccionar para o estudo dos potenciais terapêuticos destes inibidores e para o desenvolvimento de estratégias combinadas que previnam a entrada, montagem e transmissão do vírus.

Neste trabalho, concentrámos a nossa atenção em avaliar o efeito *in vitro*, na linha celular Huh7D12, de terapêuticas dirigidas às farnesil-transferases celulares responsáveis pela prenilação do L-HDAg. Os inibidores de farnesil-transferases celulares, como o FTI-277, demonstraram capacidade em inibir, de forma significativa, a produção de partículas infecciosas de HDV, devido ao facto de interferirem na prenilação do L-HDAg e aumentarem os níveis de expressão de RNA do HDV por não supressão do S-HDAg. Contudo, estes inibidores apresentam, como senão, a sua marcada toxicidade em ensaios de viabilidade celular (Bordier *et al.*, 2002; 2003). Existem, atualmente, vários inibidores do processo de prenilação em fase de teste com aplicação na supressão de neoplasias. Um dos mais promissores inibidores é o ABT-100, um inibidor de farnesil-transferases celulares que, interferindo com a atividade de proteínas como Akt, p27 e CDK2, diminui a capacidade invasiva das células de linhas celulares como as HepG2 e Huh7, reduzindo a incidência tumoral. Apesar da demonstração do potencial do ABT-100 como supressor para neoplasia do fígado, a sua eventual interferência com a biologia do HDV ainda não foi averiguada (Carlioni *et al.*, 2005).

Existem poucos estudos sobre o efeito de novas moléculas no tratamento para a hepatite delta, sendo que na maioria dos estudos *in vitro* e *in vivo*, os autores referem que existe uma necessidade de testar as terapêuticas dirigidas a alvos moleculares relevantes no HDV. Assim, neste estudo pretendeu-se avaliar a eficácia terapêutica dos inibidores de farnesil-transferases nas células da linha celular Huh7D12, avaliando o impacto em termos de viabilidade celular e correlacionando a capacidade dos fármacos de intervir nos níveis de expressão do genoma viral do HDV. Para além disso, pretendeu-se ainda analisar a ação de cada fármaco sobre a expressão de oncogenes associados ao desenvolvimento e progressão do carcinoma hepatocelular.

Os resultados obtidos demonstram que, para valores de concentração superiores a 1  $\mu\text{M}$ , tanto o FTI-277 como os compostos A e B, interferem na viabilidade das células Huh7D12. No entanto, para as mesmas concentrações, o efeito tóxico do inibidor comercial FTI-277 é mais evidente em comparação com os compostos sintetizados A e B, traduzindo que os compostos A e B possuem uma menor citotoxicidade que o composto original a partir do qual foram sintetizados. Do ponto de vista terapêutico, a redução das concentrações de fármacos é um aspeto muito importante pois diminui os potenciais efeitos secundários da utilização futura destes inibidores de farnesil-transferases na clínica.

Os resultados obtidos na análise do efeito dos inibidores de farnesil-transferases na expressão de RNA genómico do HDV estão em conformidade com os resultados dos estudos apresentados na bibliografia. Tal como referido anteriormente, o FTI-277 tem o potencial de inibir a atividade de farnesil-transferases celulares e consequentemente interferir na atividade do L-HDAg, não comprometendo a atividade da forma pequena do antígeno do HDV. Os resultados mostram que, comparativamente ao controlo correspondente à presença de DMSO, incubação das células Huh7D12 com os inibidores em estudo conduz a um aumento dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV. Para além de estar envolvida na interação com os HBsAgs e na montagem dos viriões, a prenilação do L-HDAg estimula a sua atividade de inibidor da atividade de S-HDAg. Ao interferir farmacologicamente com a prenilação do L-HDAg, a atividade do S-HDAg não é suprimida pelo L-HDAg, verificando-se um aumento nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV.

De acordo com alguns autores, a proteína cinase C possui atividade sobre a fosforilação de S-HDAg, que por sua vez é importante para a replicação do vírus (Yen *et al.*, 1996). Como tal, seria de esperar uma alteração nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV quando é usado um inibidor desta proteína. Os nossos resultados mostraram a inexistência de quaisquer alterações nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV aquando da utilização do inibidor Myricitrin, não suportando a ideia do envolvimento da PKC na regulação da atividade do S-HDAg como ativador da expressão do genoma viral. É no entanto importante referir que este inibidor tem a particularidade de inibir apenas PKC- $\alpha$  (Yen *et al.*, 1996; Meotti *et al.*, 2006). Dado que outros membros desta família de proteínas não são influenciados por este inibidor, não excluímos a hipótese do envolvimento da PKC nas etapas do ciclo de vida do HDV.

Em claro contraste com os resultados relativos à influência dos inibidores nos níveis de expressão do RNA genómico do HDV, a incubação das células Huh7D12 com FTI-277 e com os compostos A e B, resultou numa redução dos níveis de expressão de NF- $\kappa$ B e STAT3, que são duas das proteínas envolvidas em eventos intercelulares de relevo na patogénese hepática (Aggarwal, 2004; Chao *et al.*, 2017).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B destaca-se pela sua ampla gama de ações e pelo facto de diversas proteínas estarem integradas na dinâmica de sua ativação. A via do NF- $\kappa$ B é conhecida como uma ligação subjacente entre os processos inflamatórios e transformação maligna, em vários tipos de tumores, incluindo carcinoma hepatocelular. O NF- $\kappa$ B apresenta uma atividade anormal no CHC e regula uma variedade de genes relacionados com a carcinogénese, os quais medeiam a inflamação, sobrevivência, proliferação, invasão e metastização (Arsura & Cavin, 2005). O NF- $\kappa$ B é um complexo proteico presente em todos os tipos celulares, constituído por duas subunidades, p50 e p65. Na ausência de estimulação, o NF- $\kappa$ B permanece inativo no citoplasma sob a forma de um complexo com o seu inibidor, I $\kappa$ B $\alpha$ . Quando a célula é sujeita à ação de estímulos tais como citocinas, radicais livres e antígenos virais, o I $\kappa$ B sofre fosforilação e subsequente degradação. O NF- $\kappa$ B é então libertado e migra para o núcleo onde ativa a expressão de vários genes envolvidos na carcinogénese (Cervello *et al.*, 2012).

O STAT3 é um dos membros de uma vasta família de fatores de transcrição ativados por tirosinas cinases em resposta a diversas citocinas e fatores de crescimento. Quando



o STAT3 é ativado por fosforilação, ocorre a sua dimerização com subsequente translocação para o núcleo da célula onde participa na transcrição de genes responsáveis por funções diversas tais como, proliferação, diferenciação e apoptose (Brantley & Benveniste, 2008). A desregulação deste fator de transcrição tem um papel importante no desenvolvimento de vários tipos de cancro incluindo o carcinoma hepatocelular (Benekli *et al.*, 2003).

À semelhança de outros vírus, o HDV também parece ser capaz de influenciar a expressão e os níveis proteicos de uma série de transdutores de sinal e ativadores de transcrição, de uma forma ainda não totalmente esclarecida (Pascarella & Negro, 2010). Concretamente em relação à influência de HDV sobre o fator de transcrição STAT3, alguns estudos sugerem que o vírus não atua diretamente no STAT3 pois este fator de transcrição localiza-se no citoplasma e o HDAG concentra-se no núcleo da célula hospedeira, sugerindo um mecanismo secundário de ativação (Pugnale *et al.*, 2009). Um estudo recente mostrou que a expressão transitória do L-HDAG do HDV em linhas celulares de hepatoma humano conduz a um aumento da expressão do STAT3 através de um mecanismo que compreende a produção de ROS, sugerindo que a ativação do STAT3 induzida pelo HDV possa ser o mecanismo através do qual o HDV conduz ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Williams *et al.*, 2012). Estas observações parecem apoiar a ideia que os componentes do HDV, e em particular o L-HDAG, são capazes de interferir em várias funções da célula hepática.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem ainda, que a modificação pós-traducional específica do L-HDAG pode ser responsável por funções adicionais desta proteína. Modificações pós-traducionais são eventos que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos. Estas modificações podem determinar a atividade, a localização e a interação com outras proteínas (Seo & Lee, 2004; Palsuledesai & Distefano, 2015). Na sinalização, por exemplo, cascatas de cinases são ativadas ou inibidas pela adição e/ou remoção de grupos de fosfatos. Um outro exemplo, com relevância na biologia do HDV e neste estudo em particular, é a prenilação da cisteína 211 do L-HDAG que corresponde à transferência de um grupo farnesil para a cisteína presente na extremidade carboxílica da proteína. Esta modificação torna o L-HDAG mais lipofílico, facilitando a sua interação com HBsAg para a formação do envelope viral, e também ativa o seu papel

como inibidor da replicação do HDV (Shen *et al.*, 2015). Enquanto que o aumento de expressão do RNA genômico do HDV após tratamento com os inibidores em estudo foi um resultado expectável e concordante com resultados previamente descritos na literatura, mostrámos que da modulação farmacológica da atividade do L-HDAg resultam alterações na expressão de uma série de oncogenes. Estes resultados parecem sugerir que a prenilação do L-HDAg pode ser responsável por funções adicionais para além da interação com os antigénios de superfície do HBV.

O carcinoma hepatocelular é ainda um dos tumores mais agressivos e com pior prognóstico em todo mundo. A evolução neoplásica do CHC é um processo complexo que envolve vários mecanismos com alterações em diversas vias de sinalização moleculares (Lachenmayer *et al.*, 2010). A terapia dirigida tem um papel importante no tratamento do CHC, particularmente em estádios avançados, sendo que a utilização de agentes que atuam sobre moléculas específicas da carcinogénese é uma estratégia promissora.

Como os inibidores de farnesil-transferases por nós testados levaram a uma diminuição dos níveis de expressão dos transcritos de NF- $\kappa$ B e de STAT3, decidimos avaliar outros oncogenes envolvidos no processo de carcinogénese hepática. Após uma análise detalhada da literatura, concentrámos a nossa atenção em três oncogenes, PIM1, CDK2 e BMP5. Para além de serem genes cuja atividade aberrante está associada ao desenvolvimento de CHC (Svinka *et al.*, 2014; Ghouri *et al.*, 2017), um estudo recente que recorreu a ensaios de *microarrays* mostrou que os níveis de expressão destes genes são influenciados pela expressão transitória do HDV em células Huh7 (Benegiamo *et al.*, 2013). Ao analisarmos os níveis de expressão destes três genes perante a administração dos inibidores de farnesil-transferases em análise, observámos que, ao contrário do que foi verificado no caso de STAT3 e NF- $\kappa$ B, a resposta aos três fármacos não foi consensual.

Os resultados mostram ausência de variação nos níveis de expressão do transcrito de PIM1 na presença dos inibidores na concentração de 1  $\mu$ M, concluindo que os inibidores de farnesil-transferases utilizados neste estudo não têm capacidade de interferir na expressão deste gene. Este oncogene tem sido descrito como responsável por uma série de eventos intracelulares importantes para o desenvolvimento de cancro

da próstata, cancro da mama, leucemia mieloide e outras doenças hematopoiéticas (Zhao *et al.*, 2017).

Um resultado distinto foi observado na análise da expressão do gene BMP5. Verificámos que, enquanto o FTI-277 não apresenta qualquer influência nos níveis de expressão do gene BMP5, a incubação das células Huh7D12 com os compostos A e B conduz a uma redução dos níveis de expressão. As proteínas morfogénicas do osso (BMPs) são um grupo de citocinas que possuem atividade em vários tecidos e desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário, organogénese, homeostasia e regeneração dos tecidos (Sieber *et al.*, 2009). Além de desempenharem uma variedade de processos biológicos, também estão envolvidos nos processos cancerígenos de uma variedade de tumores quando a sua atividade é desregulada (Schaak *et al.*, 2013).

Por último, observámos que os níveis de expressão do gene CDK2 nas células da linha celular Huh7D12 são residuais. Contudo, a incubação das células com o FTI-277 e com o composto B conduz a um aumento dos seus níveis, enquanto que o tratamento com o composto A não apresenta qualquer influência na expressão do oncogene testado.

Da análise conjunta dos níveis de expressão dos cinco oncogenes avaliados, verificamos que estes não são afetados da mesma forma, na presença dos inibidores estudados. A hipótese mais simples capaz de explicar a ocorrência destes eventos é que durante a síntese dos compostos A e B algumas propriedades foram ganhas e/ou perdidas, o que torna a sua ação diferente do fármaco original FTI-277. Do mesmo modo, podemos verificar que os compostos A e B não apresentam atividade idêntica entre si apesar da sua síntese provir de um mesmo inibidor comercial.

Estes resultados validam a ideia de que o uso destes compostos é de interesse clínico, porém terão que ser cuidadosamente avaliados e estudados visto que, compostos similares que diferem apenas num único grupo radical apresentam comportamentos diferentes no que diz respeito aos níveis de expressão dos oncogenes testados.

O trabalho por nós efetuado apresenta duas principais limitações. A primeira limitação refere-se à metodologia utilizada na análise da expressão génica. A metodologia de reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa permite o estudo de RNA via PCR e é um método altamente sensível e específico, nomeadamente quando a quantidade de amostra é limitada. Apesar de todas as vantagens subjacentes ao uso do

PCR, denotam-se determinadas limitações na técnica. A necessidade de realização de uma eletroforese após a reação de PCR constitui uma desvantagem, visto que, a obtenção dos resultados da análise torna-se mais demorada. Também o facto dos resultados se basearem na discriminação do tamanho das sequências permite apenas uma análise qualitativa, o que torna a técnica menos precisa. Como tal, a técnica RT-PCR utilizada no estudo não permitiu demonstrar com total clareza a alteração na expressão dos genes. Sugere-se, para futuros estudos, a utilização de outras técnicas mais precisas que permitam quantificar o produto, como exemplo o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR; *real time quantitative PCR*).

A segunda limitação do estudo refere-se ao facto de partirmos do princípio que os inibidores por nós testados inibem a prenilação do L-HDAg embora não o tenhamos demonstrado experimentalmente. A ausência de anticorpos capazes de distinguir formas modificadas e não modificadas do L-HDAg não nos permitiu demonstrar que os fármacos usados interferem na prenilação do antigénio grande do HDV.

No futuro, de forma a complementar este trabalho, seria importante a realização de estudos adicionais e aplicação de novas metodologias. Seria importante por exemplo analisar a atividade dos compostos estudados em diferentes concentrações, durante um maior tempo de exposição, determinando quantidades que causam efeito sobre o vírus e sem serem prejudiciais para as células hepáticas, reduzindo deste modo a probabilidade de ocorrência de efeitos secundários adversos. Da mesma forma, seria interessante sintetizar mais derivados do inibidor comercial FTI-277 ou até mesmo dos compostos A e B com o objetivo principal de obter sintetizados com atividade similar ou melhorada, com reduzido impacto na viabilidade celular, contribuindo para uma diminuição da citotoxicidade e dos efeitos secundários. Também seria interessante analisar o efeito dos compostos A e B noutros modelos celulares, como por exemplo em linhas celulares de hepatócitos primários humanos infetados (e não infetados) com partículas virais de HDV e em modelos animais capazes de suportar replicação viral (Freitas *et al.*, 2012). Por último, sugerimos ainda que seria importante complementar este estudo com uma análise pormenorizada do impacto que estes fármacos exercem na expressão da totalidade dos genes humanos. Concentrámos a nossa atenção na determinação dos níveis de expressão do RNA genómico do HDV e de 5 genes cujo papel está bem demonstrado no desenvolvimento e na progressão de CHC. Num futuro próximo,

através de técnicas de sequenciação de RNA, pretendemos analisar a totalidade das alterações transcriptômicas induzidas por estes fármacos.

Em conclusão, fármacos dirigidos a farnesil-transferases celulares podem constituir uma nova abordagem terapêutica promissora no tratamento da hepatite delta crônica e como supressores de processos cancerígenos. A análise dos efeitos em termos de viabilidade celular demonstrou que os compostos A e B são menos tóxicos para as células da linha celular Huh7D12 do que o inibidor comercial FTI-277 face às mesmas concentrações de fármaco. Verificou-se que os compostos A e B apresentam o mesmo efeito sobre a expressão do RNA genómico do HDV e os oncogenes STAT3 e NF-kB que o fármaco comercial FTI-277, porém com menor interferência na viabilidade celular, o que pode contribuir para melhorar a eficácia terapêutica com diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários.

Este trabalho constitui-se assim como uma primeira abordagem no desenvolvimento de uma nova terapêutica no tratamento da hepatite delta crônica, bem como na interferência no desenvolvimento dos processos cancerígenos associados à infeção. No entanto, identificaram-se limitações importantes que, não obstante a sua relevância, adequam estes resultados a um processo ainda preliminar de desenvolvimento.

## Referências bibliográficas

- Abbas, Z., Abbas, M., Abbas, S., Shazi, L. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 2015: 777-786.
- Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kB: the enemy within. *Cancer cell*, 2004: 203-208.
- Alves, C., Branco, C., Cunha, C. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Advances in Virology*, 2013.
- Alves, R., Alves, D., Gruz, B., Matos, C., Viana, M., Hariz, M., Terrabuio, D., Kondo, M., Gampel, O., Polletti, P. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Annals of Hepatology*, 2011: 21-27.
- Arsura, M., Cavin, L.G. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Letters*, 2005: 157-169.
- Aslam, H., Qadeer, R., Kashif, M., Rehan, M., Afsar, S. Unique side effects of interferon. *Journal of Pakistan Medical Association*, 2015: 895-897.
- Been, M.D. HDV ribozymes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006: 47-65.
- Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Guarnieri, V., Niro, G.A., Andriulli, A., Pazienza, V. Hepatitis delta virus induces specific DNA methylation processes in Huh-7 liver cancer cells. *FEBS Letters*, 2013: 1424-1428.
- Benekli, M., Baer, M.R., Baumann, H., Wetzler, M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *American Society of Hematology*, 2003: 2940-2954.
- Bichko, V.V., Khudyakov, Y.E., Taylor, J.M. A novel form of hepatitis delta antigen. *Journal of Virology*, 1996: 3248-3251.
- Bordier, B.B., Marion, P.L., Ohashi, K., Kay, M.A., Greenberg, H.B., Casey, J.L., Glenn, J.S. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *Journal of Virology*, 2002: 10465-10472.
- Bordier, B.B., Ohkanda, J., Liu, P., Lee, S.Y., Salazar, F.H., Marion, P.L., Ohashi, K., Meuse, L., Kay, M.A., Casey, J.L., Sebti, S.M., Hamilton, A.D., Glenn, J.S. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical Investigation*, 2003: 407-414.

- Brantley, E., Benveniste, E. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Molecular Cancer Research*, 2008: 675-684.
- Carloni, V., Vizzutti, F., Pantaleo, P. Farnesyltransferase inhibitor, ABT-100, is a potent liver cancer chemopreventive agent. *Clinical Cancer Research*, 2005: 4266-4274.
- Casey, J.L., Gerin, J.L. Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of antigenomic RNA. *Journal of Virology*, 1995: 7593-7600.
- Cervello, M., McCubrey, J.A., Cusimano, A., Lampiasi, N., Azzolina, A., Montalto, G. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*, 2012: 236-260.
- Cha, L., Berry, C.M., Nolan, D., Castley, A., Fernandez, S., French, M.A. Interferon-alpha, immune activation and immune dysfunction in treated HIV infection. *Clinical e Translational Immunology*, 2014.
- Chang, J., Nie, X., Chang, H.E., Han, Z., Taylor, J. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *Journal of Virology*, 2008: 1118-1127.
- Chang, M.F., Baker, S.C., Soe, L.H., Kamahora, T., Keck, J.G., Makino, S., Govindarajan, S., Lai, M.M.C. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA binding activity. *Journal of Virology*, 1988: 2403-2410.
- Chao, M., Hsieh, S.Y., Taylor, J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *Journal of Virology*, 1990: 5066-5069.
- Chao, W., Deng, J., Li, P., Liang, Y., Huang, G. 3,4-Dihydroxybenzalactone suppresses human non-small cell lung carcinoma cells metastasis via suppression of epithelial to mesenchymal transition, ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK/MMP and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Molecules*, 2017.
- Chen, C.W., Tsay, Y.G., Wu, H.L., Lee, C.H., Chen, D.S., Chen, P.J. The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 2002: 33058-33067.
- Chen, P.J., Kalpana, G., Goldberg, J., Mason, W., Werner, B., Gerin, J., Taylor, J. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1986: 8774-9778.
- Chen, Y., Huang, W., Hong, S., Tsay, Y., Chen, P. ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *Journal of Virology*, 2008: 9345-9358.

- Chou, H.C., Hsieh, T.Y., Sheu, G.T., Lai, M.M. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of Virology*, 1998: 3684-3690.
- Cunha, C., Monjardino, J., Chang, D., Krause, S., Carmo-Fonseca, M. Location of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells. *RNA*, 1998: 680-693.
- Durantel, D., Zoulim, F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *Journal of Hepatology*, 2016: s117-s131.
- Einav, S., Glenn, J.S. Prenylation inhibitors: a novel class of antiviral agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003: 883-886.
- Farci, P. Delta hepatitis: an update. *Journal of Hepatology*, 2003: S212–S219.
- Farci, P. Treatment of chronic hepatitis D: new advances, old challenges. *Hepatology*, 2006: 536-539.
- Farci, P., Mandas, A., Coiana, A., Lai, M.E., Desmet, V., Eyken, P.V., Gibo, Y., Caruso, L., Scaccabarozzi, S., Criscuolo, D., Ryff, G.C., Balestrieri, A. Treatment of chronic hepatitis D with Interferon alfa-2a. *The New England Journal of Medicine*, 1994: 88-94.
- Farci, P., Niro, G. Clinical features of hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, 228-236: 2012.
- Farci, P., Roskams, T., Chessa, L., Peddis, G., Mazzoleni, A.P., Scioscia, R., Serra, G., Lai, M.E., Loy, M., Caruso, L., Desmet, V., Purcell, R.H., Balestrieri, A. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 2004: 1740-1749.
- Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zigni, I., Realdi, G., Schalm, S. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*, 2000: 420-426.
- Ferré-D'Amaré, A.R., Zhou, K., Doudna, J.A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*, 1998: 567-574.
- Fiedler, M., Roggendorf, M. Immunology of HDV infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006: 187-209.
- Flores, R., Owens, R.A., Taylor, J. Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus. *Current Opinion in Virology*, 2016: 87-94.
- Fonseca, J.C.F. Hepatite Delta. In *Hepatite Delta*, de Fonseca, J.C.F., 1-66. Manaus: Imprensa Universitaria, 1993.



- Fonseca, J.C.F., Ferreira, L.C.L., Brasil, L.M., Castilho, M.C., Moss, R., Barone, M. Labrea hepatitis: role of HAV, HBV and HDV infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1992: 609-612.
- Freitas, N., Salisse, J., Cunha, C., Toshkov, I., Menne, S., Gudima, S.O. Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks. *Hepatology*, 2012: 76-85.
- Fu, T.B., Taylor, J. The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *Journal of Virology*, 1993: 6965-6972.
- Gaeta, G.B., Stroffolini, T., Chiaramonte, M., Ascione, T., Stornaiuolo, G., Lobello, S., Sagnelli, E., Brunetto, M.R., Rizzetto, M. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology*, 2000: 824-827.
- Gerin, J.L. The taxonomy of hepatitis delta virus. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*, de Nishioka, M.D., Suzuki, H., Mishiro, S., Oda, T., 63-64. Tokyo: Springer, 1994.
- Gerin, J.L., Casey, J.L., Purcell, R.H. Hepatitis delta virus. In *Virology*, de Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Ghouri, Y.A., Mian, I., Rowe, J.H. Review of hepatocellular carcinoma: epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis*, 2017.
- Glenn, J.S., Watson, J.A., Havel, C.M., White, J.M. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science*, 1992: 1331-1333.
- Govindarajan, S., Chin, K.P., Redeker, A.G., Peters, R.L. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent. *Gastroenterology*, 1984: 1417-1420.
- Goyal, A., Murray, J. Effect of interferon-alpha therapy on hepatitis D virus. *Hepatology*, 2015: 2117-2118.
- Greco-Stewart, V., Pelchat, M. Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus. *Viruses*, 2010: 189-212.
- Gudima, S., Chang, J., Moraleda, G., Azvolinsky, A., Taylor, J. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *Journal of Virology*, 2002: 3709-3719.
- Han, Z., Alves, C., Gudima, S., Taylor, J. Intracellular localization of hepatitis delta virus proteins in the presence and absence of viral RNA accumulation. *Journal of Virology*, 2009: 6457-6463.
- He, L.F., Ford, E., Purcell, P.H., London, W.T., Phillips, J., Gerin, J.L. The size of the hepatitis delta agent. *Journal of medical virology*, 1989: 31-33.

- Heidrich, B., Deterding, K., Tillmann, H.L., Raupach, R., Manns, M.P., Wedemeyer, H. Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe. *Journal of Viral Hepatology*, 2009: 883-894.
- Heller, T., Rotman, Y., Koh, C., Clark, S., Haynes-Williams, V., McBurney, R., Schmid, P., Albrecht, J., Kleiner, D., Ghany, M., Liang, T., Hoofnagle, J. Long term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2014: 93-104.
- Hoofnagle, J. Therapy of viral hepatitis. *Digestion*, 1998: 563-578.
- Hourioux, C., Sureau, C., Poisson, F., Brand, D., Goudeau, A., Roingeard, P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope protein domains. *Journal of General Virology*, 1998: 1115-1119.
- Hsieh, S.Y., Chao, M., Coates, L., Taylor, J. Hepatitis delta. genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of Virology*, 1990: 3192-3198.
- Hsieh, S.Y., Taylor, J. Regulation of polyadenylation of hepatitis delta virus antigenomic RNA. *Journal of Virology*, 1991: 6438-6446.
- Hsieh, S.Y., Yang, P.Y., Ou, J.T., Chu, C.M., Liaw, Y.F. Polyadenylation of the mRNA of hepatitis delta virus is dependent on the structure of the nascent RNA and regulated by the small or large delta antigen. *Nucleic Acids Research*, 1994: 391-396.
- Hsieh, T.H., Liu, C.J., Chen, D.S., Chen, P.J. Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2006: 869-881.
- Huang, C.R., Lo, S.J. Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*, 2014: 14589-14597.
- Huang, W.H., Chen, Y.S., Chen, P.J. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *Journal of Virology*, 2008: 692-699.
- Hughes, S.A., Wedemeyer, H., Harrison, P. Hepatitis delta virus. *The Lancet*, 2011: 73-85.
- Huo, T.I., Wu, J.C., Wu, S.I., Chang, A.L., Lin, S.K., Pan, C.H., Huang, Y.H., Chang, F.Y., Lee, S.D. Changing seroepidemiology of hepatitis B, C and D virus infections in high-risk populations. *Journal of Medical Virology*, 2003: 41-45.
- Hwang, S.B., Lai, M.M. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Virology*, 1993: 7659-7662.

- Kabaçam, G., Dalekos, G.N., Çakaloglu, Y., Zachou, K., Bock, T., Erhardt, A., Zeuzem, S., Tabak, F., Yalçın, K., Bozdayi, A.M., Dienes, H.P., Bozkaya, H., Manns, M., Wedemeyer, H., Yurdaydin, C. Pegylated interferon-based treatment in patients with advanced liver disease due to chronic delta hepatitis. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 2012: 560-568.
- Kuo, M.Y.P., Goldenberg, J., Coates, L., Mason, W., Gerin, J., Taylor, J. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure and applications. *Journal of Virology*, 1988: 1855-1861.
- Lachenmayer, A., Alsinet, C., Chang, C.Y., Llovet, J.M. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 2010: s264-s272.
- Lau, D.T.Y., Doo, E., Park, Y., Kleiner, D.E., Schmid, P., Kuhns, M.C., Hoofnagle, J.H. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology*, 1999: 546-549.
- Lazinski, D.W., Taylor, J.M. Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: Regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *Journal of Virology*, 1995: 1190-1200.
- Lee, C.H., Chang, S.C., Wu, C.H., Chang, M.F. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2001: 8142-8148.
- Lee, C.Z., Chen, P.J., Lai, M.M., Chen, D.S. Isoprenylation of the large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology*, 1994: 169-175.
- Lee, C.Z., Lin, J.H., Chao, M., McKnight, K., Lai, M.M. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of Virology*, 1993: 2221-2227.
- Lempp, F.A., Urban, S. Hepatitis delta virus: replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen. *Viruses*, 2017.
- Levy, D.E., Inghirami, G. STAT3: a multifaceted oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006: 10151-10152.
- Li, Y.J., Macnaughton, T., Gao, L., Lai, M.M. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *Journal of Virology*, 2006: 6478-6486.
- Lin, L., Liu, A., Peng, Z., Lin, H.J., Li, P.K., Li, C., Lin, J. STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells. *Cancer Research*, 2011: 7226-7237.

- Llovet, M.J., Burroughs, A., Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2003: 1907-1917.
- Lope, C., Tremosini, S., Forner, A., Reig, M., Bruix, J. Management of HCC. *Journal of Hepatology*, 2012: S75-S87.
- Lozano, J.L., Crespo, J., de la Cruz, F., Casafont, F., Lopez-Arias, M.J., Martín-Ramos, L., Pons-Romero, F. Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and histological activity of chronic delta hepatitis. *Medical Microbiology and Immunology*, 1994: 159-167.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012: 2095-2128.
- Macnaughton, T.B., Wand, Y.J., Lai, M.M. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage. *Journal of Virology*, 1993: 2228-2238.
- Madejón, A., Bartolomé, J., Carreño, V. In vitro inhibition of the hepatitis delta virus replication mediated by interferon and trans-ribozyme or antisense probes. *Journal of Hepatology*, 1998: 385-393.
- Makuwa, M., Caron, M., Souquiere, S., Malonga-Mouelet, G., Mahe, A., Kazanji, M. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008: 754-756.
- Makuwa, M., Mints-Ndong, A., Souquière, S., Nkoghe, D., Leroy, E.M., Kazanji, M. Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009: 2265-2268.
- Maltese, W.A. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1990: 3319-3328.
- Manesis, E.K., Vourli, G., Dalekos, G., Vasiliadis, T., Manolaki, N., Hounta, A., Koutsounas, S., Vafiadis, I., Nikolopoulou, G., Giannoulis, G., Germanidis, G., Papatheodoridis, G., Touloumi, G. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: a 13-year prospective study. *Journal of Hepatology*, 2013: 949-956.
- Manock, S.R., Kelley, P.M., Hyams, K.C., Douce, R., Smalligan, R.D., Watts, D.M., Sharp, T.W., Casey, J.L., Gerin, J.L., Engle, R., Alava-Alprecht, A., Martínez, C.M., Bravo, N.B., Guevara, A.G., Russell, K.L., Mendoza, W., Vimos, C. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000: 209-213.

Meotti, F.C., Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A., Calixto, J.B., Santos, A.R. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006: 789-796.

Modahl, L.E., Lai, M.M.C. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and regulation. *Journal of Virology*, 1998: 5449-5456.

Modahl, L.E., Macnaughton, T.B., Zhu, N., Johnson, D.L., Lai, M.M.C. RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Molecular and cellular biology*, 2000: 6030-6039.

Mu, J.J., Chen, D.S., Chen P.J. The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication. *Journal of Virology*, 2001: 9087– 9095.

Murphy, F.A. Virus taxonomy. In *Fields Virology*, de Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 15-57. Philadelphia: Raven Press, 1996.

Niro, G.A., Rosina, F., Rizzetto, M. Treatment of hepatitis D. *Journal of Viral Hepatology*, 2005: 2-9.

Niro, G.A., Smedile, A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Current Infectious Disease Reports*, 2012: 9-14.

O'Malley, B., Lazinski, D.W. Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen. *Journal of Virology*, 2005: 1142-1153.

Otto, J.C., Casey, P.J. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996: 4569-4572.

Pahl, H.L., Baeuerle, P.A. The ER-overload response: activation of NF- $\kappa$ B. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997: 63-67.

Palsuledesai, C.C., Distefano, M.D. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chemical Biology*, 2015: 51-62.

Park, C., Oh, S., Kang, S., Lim, Y., Hwang, S.B. Hepatitis delta virus large antigen sensitizes to TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling. *Molecules and Cells*, 2009: 49-55.

Pascarella, S., Negro, F. Hepatitis D virus: an update. *Liver International*, 2010: 7-21.

Pereira, M., Siba, I.P., Chioca, L.R., Correia, D., Vital, M.A.B.F., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S., Adreatini, R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2011: 1636-1644.

- Ponzetto, A., Hoyer, B.H., Engle, R., Purcell, R.H., Gerin, J.L. Triation of the infectivity of hepatitis Delta virus in chimpanzees. *Journal of Infectious Diseases*, 1987: 72-78.
- Pugnale, P., Pazienza, V., Guilloux, K., Negro, F. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology*, 2009: 398-406.
- Purcell, R.H., Gerin, J.L. Hepatitis delta virus. In *Fields Virology*, de Knipe, D.M., Howley, P.M., Chamock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Strauss, S.E., Fields, B.N., 2819-2829. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- Purcell, R.H., Gerin, J.L. Hepatitis delta virus. In *Virology*, de Fields, B.N., Knipe, D.M. New York: Raven Press, 1990.
- Ramalho, F., Carvalho, G., Bonino, F., Baptista, A., de Moura, M.C. Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1987: 409-417.
- Reid, C.E., Lazinski, D.W. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozymeprocessed RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000: 424-429.
- Rizzetto, M. Hepatitis D: thirty years after. *Journal of Hepatology*, 2009: 1043-1050.
- Rizzetto, M. The adventure of delta. *Liver International*, 2016: 135-140.
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Verme, G. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (  $\delta$ /anti- $\delta$ ) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut*, 1997: 997-1003.
- Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W., Purcell, R.H., Gerin, J.L.  $\delta$  Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980: 6124-6128.
- Rizzetto, M., Verme, G., Rechia, S., Bonino, F., Arico, S., Caizia, R., Picciotto, A., Colombo, M., Popper, H. Chronic HBsAg positive hepatitis with intrahepatic expression of delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Annals of Internal Medicine*, 1983: 437-441.
- Saldanha, J.A., Thomas, H.C., Monjardino, J.P. Cloning and sequencing of RNA of hepatitis delta virus isolated from human serum. *Journal of General Virology*, 1990: 1603-1606.

- Sangiovanni, A., Prati, G., Fasani, P., Ronchi, G., Romeo, R., Manini, M., Ninno, E., Morabito, A., Colombo, M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C: a 17-year cohort study of 214 patients . *Hepatology*, 2006: 1303-1310.
- Sato, S., Wong, S.K., Lazinski, D.W. Hepatitis delta virus minimal substrates competent for editing by ADAR1 and ADAR2 . *Journal of Virology*, 2001: 8547-8555.
- Schaak, K., Johnsen, I., Beuschlein, F. BMP5 treatment of adrenocortical carcinoma delays tumor growth via activation of endogenous anti-tumoral macrophages. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2013: 121-128.
- Schulze, A., Gripon, P., Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 2007: 1759–1768.
- Schulze, A., Schieck, A., Ni, Y., Mier, W., Urban, S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *Journal of Virology*, 2010: 1989-2000.
- Seo, J., Lee, K.J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004: 44-55.
- Shen, M., Pan, P., Li, Y., Li, D., Yu, H., Hou, T. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discovery Today*, 2015: 267-276.
- Shirvani-Dastgerdi, E., Tacke, F. Molecular interactions between hepatitis B virus and delta virus. *World Journal of Virology*, 2015: 36-41.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P. Recent advances in BMP receptor signaling . *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009: 343-355.
- Smedile, A., Rizzetto, M., Gerin, J. Advances in hepatitis D virus biology and disease. *Progress in Liver Diseases*, 1994: 157-175.
- Su, C.W., Huang, Y.H., Huo, T.I., Shih, H.H., Sheen, I.J., Chen, S.W., Lee, P.C., Lee, S. D., Wu, J.C. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*, 2006: 1625-1635.
- Sureau, C. Hepatitis delta virus: HDV-HB interactions. In *Hepatitis Delta Virus*, de Handa, H., Yamaguchi, Y., 10-20. Berlin: Springer, 2006.
- Sureau, C., Guerra, B., Lanford, R.E. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *Journal of Virology*, 1993: 366–372.

- Svinka, J., Mikulits, W., Eferl, R. STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives. *Hepatic Oncology*, 2014: 107-120.
- Tavanez, J.P., Cunha, C., Silva, M.C., David, E., Monjardino, J., Carmo-Fonseca, M. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 2002: 637-646.
- Taylor, J.M. Hepatitis D virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015.
- Taylor, J.M. Hepatitis delta virus and its replication. In *Fields Virology*, de Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 479-483. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1996.
- Taylor, J.M. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World Journal of Gastroenterology*, 2014: 2971-2978.
- Taylor, J.M. The structure and replication of hepatitis delta virus. *Annual Reviews of Microbiology*, 1992: 253-276.
- Torres, J.R. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. *Gut*, 1996: s48-s55.
- Triantos, C., Kalafateli, M., Nikolopoulou, V., Burroughs, A. Meta-analysis: antiviral treatment for hepatitis D. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2012: 663-673.
- Velosa, J., Ramalho, F., Serejo, F., Marinho, R., de Moura, M.C. Chronic hepatitis: the etiological spectrum. The implications for treatment. *Acta Medica Portuguesa*, 1993: 233-238.
- Waris, G., Tardif, K.D., Siddiqui, A. Endoplasmic reticulum (ER) stress, hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kB and STAT-3. *Biochemical Pharmacology*, 2002: 1425-1430.
- Williams, V., Brichler, S., Khan, E., Chami, M., Deny, P., Kremsdorf, D., Gordien, E. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF-kB via oxidative stress. *Journal of viral hepatitis*, 2012: 744-753.
- Wong, S.K., Lazinski, D.W. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002: 15118-15123.
- Wu, J.C. Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006: 173-186.
- Wu, J.C., Chen, C.M., Sheen, I.J., Lee, S.D., Tzeng, H.M., Choo, K.B. Evidence of transmission of hepatitis Delta virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology*, 1995: 1656-1660.



Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M.M., Handa, H. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science*, 2001: 124-127.

Yan, H., Liu, Y., Sui, J., Li, W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Research*, 2015: 24-30.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 2012.

Yeh, T.S., Lo, S.J., Chen, P.J., Lee, Y.H.W. Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *Journal of Virology*, 1996: 6190–6198.

Yurdaydin, C. Treatment of chronic delta hepatitis. *Seminars in Liver Disease*, 2012: 237-244.

Yurdaydin, C., Bozkaya, H., Onder, F.O., Sentürk, H., Karaaslan, H., Akdogan, M., Cetinkaya, H., Erden, E., Erkan-Esin, O., Yalçın, K., Bozdayi, A.M., Schinazi, R.F., Gerin, J.L., Uzunalioglu, O., Ozden, A. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon. *Journal of Viral Hepatology*, 2008: 314-321.

Zhao, W., Qiu, R., Li, P., Yang, J. PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*, 2017.